

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra experimentální biologie rostlin

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



**Utilizace vybraných sacharidů houbového původu orchidejemi a jejich možný přenos v
mykorhize**

Utilization of selected fungal saccharides by orchids and possibility of their transport in
mycorrhiza

Diplomová práce

Bc. Magdalena Dostálová

Praha 2016

Školitel: RNDr. Jan Ponert

Konzultantka: doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Nepoužila jsem tuto práci ani její podstatnou část k získání jiného nebo obdobného akademického titulu.

V Praze dne 11. srpna 2016

PODĚKOVÁNÍ

Zde bych ráda poděkovala svému školiteli, Janu Ponertovi, na prvním místě za to, že mě vůbec vzal pod svá křídla. Děkuji mu rovněž za všechny metody, které mě naučil, i za konzultace a rady k diplomové práci. Děkuji taktéž docentce Heleně Lipavské, jejíž připomínky výrazně přispěly k celkové podobě této práce. Můj vděk patří i Stanislavu Vosolsobě, který mi pomohl s vyhledáním sekvencí druhu *Ludusia discolor*. Dále bych chtěla vyjádřit dík všem lidem z laboratoře 007, za ochotnou pomoc a za příjemné prostředí. Zvláště bych pak chtěla poděkovat Tomáši Figurovi, který mě do této laboratoře přivedl. Dík patří i lidem z laboratoře 210, kde jsem prováděla všechny molekulárně biologické metody a snažila se překážet co nejméně. Zejména pak za ty chvíle, kdy se mi to nedařilo.

Bez váhání musím poděkovat i své rodině – rodičům za to, že mě po celou dobu studia podporovali duševně i materiálně, sestře za nekonečné rozhovory o biologii a bratrovi za udržování zdravé morálky při učení i psaní této práce. Chtěla bych poděkovat i Jáchymovi za to, že mi často dobře radil a projevoval pochopení, když bylo třeba.

1 Obsah

2	Seznam opakovaně používaných zkratk.....	7
3	Abstrakt	8
4	Úvod.....	9
5	Cíle práce.....	10
6	Literární přehled	11
6.1	Specifika orchidejí	11
6.1.1	Semena orchidejí	11
6.1.2	Interakce s houbou	12
6.1.3	Výsev orchidejí <i>in vitro</i>	12
6.1.4	Klíčení orchidejí	13
6.2	Mykorhizní symbióza	14
6.3	Orchideoidní mykorhizní symbióza.....	15
6.3.1	Typy orchideoidní mykorhizy	15
6.3.2	Průběh orchideoidní mykorhizní kolonizace.....	16
6.3.3	Specifita a povaha orchideoidní mykorhizy	17
6.3.4	Toky látek v orchideoidní mykorhize	18
6.4	Cukerné alkoholy v rostlinách a houbách	23
6.4.1	Manitol	23
6.4.2	Sorbitol	25
7	Materiál a metody	28
7.1	Kultivace rostlinného materiálu.....	28
7.1.1	Kultivační prostory	28
7.1.2	Kultivační média.....	28
7.1.3	Výsevy semen.....	31
7.1.4	Kultivace starších rostlin.....	32
7.2	Práce s <i>Escherichia coli</i>	32
7.2.1	Média a kultivace.....	32
7.2.2	Transformace bakterií	32
7.2.3	Příprava kompetentních bakterií.....	33
7.3	Analýza vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií	34
7.3.1	Příprava vzorků pro zjištění obsahu rozpustných sacharidů	34
7.3.2	Příprava vzorků pro zjištění obsahu škrobu	34
7.3.3	HPLC	35
7.4	Práce s nukleovými kyselinami	35

7.4.1	Izolace cDNA	35
7.4.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	36
7.4.3	Agarózová elektroforéza	38
7.4.4	Klonování a transformace	38
7.4.5	Izolace plazmidů	38
7.4.6	Sekvenování	38
7.4.7	Restrikční štěpení.....	38
7.5	Obrazová a statistická analýza.....	39
7.6	Design jednotlivých experimentů	40
7.6.1	Efekt sacharidů a glutaminu	40
7.6.2	Efekt glutaminu a sacharózy	40
7.6.3	Efekt manitolu a sacharózy	41
7.6.4	Symbiotický výsev <i>D. majalis</i>	42
8	Výsledky.....	43
8.1	Sekvence manitoldehydrogenázy a sorbitoldehydrogenázy.....	43
8.2	Efekt sacharidů a glutaminu	44
8.2.1	Růst protokormů	44
8.2.2	Klíčivost	46
8.2.3	Obsah endogenních rozpustných sacharidů	48
8.2.4	Obsah škrobu	50
8.2.5	Míra exprese SDH	50
8.3	Efekt glutaminu a sacharózy	52
8.3.1	Růst protokormů	52
8.3.2	Klíčivost	53
8.3.3	Obsah endogenních rozpustných sacharidů	53
8.4	Efekt manitolu a sacharózy	55
8.4.1	Růst protokormů	55
8.4.2	Klíčivost	57
8.4.3	Obsah endogenních rozpustných sacharidů	58
8.5	Symbiotický výsev <i>D. majalis</i>	61
8.5.1	Růst protokormů	61
8.5.2	Klíčivost	61
8.5.3	Obsah endogenních rozpustných sacharidů	62
8.5.4	Míra exprese SDH	62
9	Diskuze.....	63

9.1	Utilizace vybraných sacharidů orchidejovými protokormy	63
9.1.1	Arabitrol	63
9.1.2	Erythritol	63
9.1.3	Glycerol.....	65
9.1.4	Xylitol	66
9.1.5	Manitol	66
9.1.6	Sorbitol.....	68
9.1.7	Manóza.....	69
9.1.8	Sukralóza.....	70
9.2	Utilizace glutaminu orchidejovými protokormy	71
9.3	Přenos C v orchideoidní mykorrhize.....	72
10	Závěr.....	73
11	Příloha.....	74
12	Literární zdroje.....	76

2 Seznam opakovaně používaných zkratek

AM	arbuskulární mykorhizní symbióza, arbuskulárně mykorhizní
ANOVA	analýza rozptylu (<i>analysis of variance</i>)
dNTPs	deoxynukleotidy
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
MDH	manitoldehydrogenáza
MST2	<i>monosaccharide transporter 2</i> – monosacharidový přenašeč
NAD	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukována forma)
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukována forma)
OM	orchideoidní mykorhizní symbióza, orchideoidně mykorhizní
PCR	polymerázová řetězová reakce
sd	směrodatná odchylka (<i>standard deviation</i>)
SDH	sorbitoldehydrogenáza

3 Abstrakt

Orchideoidní mykorhizní symbióza (OM) se týká téměř desetiny druhů rostlin. Pro orchideje je ustavení této symbiózy naprosto kritické, neboť v přírodě nedokáží samy vyrůst bez externí dodávky energie, kterou jim poskytuje symbiotická houba. Jak probíhá transport látek mezi oběma symbionty, není známo. Trehalóza je zatím jedinou látkou považovanou za pravděpodobného účastníka tohoto přenosu. Tato práce si klade za cíl zjistit, které další houbové sacharidy by mohly v tomto procesu hrát roli. Na semenáčcích orchideje *Dactylorhiza majalis* byla zjišťována schopnost utilizace jednotlivých látek. Výstupy ukázaly, že arabitol, erythritol, manitol a sukralóza nejsou využívány, zatímco xylitol, sorbitol, glycerol a manóza využívány jsou. Orchidejemi není zpracovávána ani aminokyselina glutamin, rovněž podezříváná z účasti na transportu v OM. Výsledkem práce byla i izolace částečné sekvence DNA enzymu sorbitoldehydrogenázy z modelové rostliny.

Klíčová slova: orchideoidní mykorhizní symbióza, cukerné alkoholy, manóza, glutamin, tok uhlíku, tok energie, sorbitoldehydrogenáza, *in vitro*

Abstract

Orchideoid mycorrhizal symbiosis (OM) can be found in nearly one tenth of higher plant species. This symbiosis is absolutely critical for orchids as they are unable to grow from seeds without external energy which is in nature provided by symbiotic fungi. The mechanism of transport between symbionts remains unknown. It is supposed that trehalose is one of the substances transported from fungi to plants as the source of energy. This thesis mainly aims to find out which other fungal saccharides could contribute to the process. The ability to utilize selected compounds was tested on protocorms of the common marsh orchid, *Dactylorhiza majalis*. The results showed that arabitol, erythritol, mannitol and sucralose are not utilized, while xylitol, sorbitol, glycerol and mannose are. Glutamin, an amino acid also suspected of participation in the OM transport, does not suffice as a source of energy. In orchids there were identified three groups of sequences coding for manitol dehydrogenase and two groups of sequences coding for sorbitol dehydrogenase.

Key words: orchideoid mycorrhizal symbiosis, sugar alcohols, mannose, glutamine, carbon flow, energy flow, sorbitol dehydrogenase, *in vitro*

4 Úvod

Mykorhizní symbióza je na naší planetě nejrozšířenější symbiózou, již se účastní rostliny. Nejstarší zaznamenané formy této symbiózy jsou staré více než 400 miliónu let. Mykorhizní asociace významně přispívá k fyziologickému stavu rostlin, tím pádem nezanedbatelně ovlivňuje i druhové složení společenstev. Je možno ji nalézt u převážné většiny suchozemských druhů. Orchideoidní mykorhizní symbióza je přítomná u orchidejí, které tvoří necelou desetinu všech rostlinných druhů. Pro orchideje je v přírodě naprosto nepostradatelná, neboť zajišťuje výživu klíčovým semenům. Jakým způsobem a v jaké podobě jsou energeticky bohaté látky na rozhraní hub a kořenů rostlin přenášeny, není známo. Je pravděpodobné, že se na tomto přenosu podílí sacharidy, neboť běžně fungují jako dobře zpracovatelný zdroj energie. Některé sacharidy byly již z tohoto hlediska zkoumány. Stále však zůstává řada dosud netestovaných látek, které by se na tomto ději mohly podílet. Tato práce se proto zaměřuje na studium možností utilizace vybraných látek protokormy orchidejí, zejména cukerných alkoholů houbového původu. Dále se práce zabývá identifikací genů kódujících dva enzymy sacharidového metabolismu v modelové orchideji *Dactylorhiza majalis*. Tyto enzymy – manitoldehydrogenáza a sorbitoldehydrogenáza, by se totiž mohly účastnit zpracování přenášených cukerných alkoholů. Porozumění tomu, které látky mohou být přenášeny z mykorhizních hub do orchidejí jako zdroj energie, je zcela klíčové pro pochopení orchideoidní mykorhizy.

5 Cíle práce

Hlavní cíl:

Zjistit, které rozpustné sacharidy houbového původu mohou sloužit jako zdroj energie a uhlíku pro protokormy *Dactylorhiza majalis* a zda mohou být nahrazeny aminokyselinou glutaminem

Dílčí cíle:

- Otestovat efekt vybraných sacharidů houbového původu na protokormy *D. majalis*
- Otestovat efekt glutaminu na protokormy *D. majalis*
- Ověřit, zda protokormy *D. majalis* nemohou využít sukralózu
- Otestovat efekt glutaminu na protokormy *D. majalis* za přítomnosti dobře využitelného sacharidu
- Otestovat efekt manitolu na protokormy *D. majalis* za přítomnosti dobře využitelného sacharidu
- Izolovat geny manitoldehydrogenázy a sorbitoldehydrogenázy z *D. majalis* a zjistit míru jejich exprese v rostlinách pěstovaných asymbioticky na médiích s jednotlivými testovanými sacharidy a u rostlin pěstovaných symbioticky

6 Literární přehled

Čeď vstavačovitých (*Orchidaceae*) patří mezi čeledi s nejvyšším počtem taxonů vůbec. Nejnovější práce uvádí 736 známých rodů (Chase et al. 2015). V literatuře se počet druhů pohybuje okolo 25 000, Zotz uvádí 27 135 druhů (Zotz 2013). Původ této druhové bohatosti bývá přičítán zejména specifickému způsobu rozmnožování, které je často závislé na konkrétním druhu opylovače. Dalšími přispívajícími faktory jsou epifytizmus a CAM metabolismus, dále existence polinií, útvarů spojujících velké množství pylových zrn dohromady, a tvorba šálivých květů (Givnish et al. 2015). Mimo to se na druhové bohatosti čeledi zřejmě podepsala specializace na biotopy roztroušené v krajině a závislost na mykorhizní symbióze, která je nutná pro výživu a růst mladých orchidejí (Benzing 1981). Právě tímto aspektem života orchidejí, orchideoidní mykorhizní symbiózou, se budu v následujícím textu zabývat.

6.1 Specifika orchidejí

6.1.1 Semena orchidejí

Orchideje se množí pomocí velmi malých, takzvaných prachových semen, kterých produkují velké množství – obvykle desítky až stovky tisíc (jako maximum bývá uváděno až 4 000 000 semen v jednom semeníku orchideje *Cycnoches ventricosum*) (Arditti & Ghani 2000). Tato semena mají velmi málo zásobních látek, obsahují malé množství lipidických látek a proteinových tělísek a jen velmi málo rozpustných sacharidů (Rasmussen 1990; Richardson et al. 1992). U některých druhů se vykytuje i malé množství škrobových zrn (Harrison 1977). Existují i druhy tvořící větší škrobové zásoby, jako je *Calypso bulbosa* (Yeung & Law 1992), *Cymbidium ensifolium* (Mei-sheng et al. 1985), *Bletilla striata* (Shun-xing & Jin-tang 1990), ty jsou však zřejmě spíše výjimkou. Typické orchidejové semeno sestává z živého embrya a osemení tvořeného mrtvými buňkami, charakteristickým znakem je i absence endospermu (Pridgeon et al. 2003). Embryo je zpravidla velmi málo diferencované, tvořené víceméně izodiametrickými buňkami, bývá rozlišitelná pouze povrchová vrstva epidermis. Buňky jsou v anteriorní části embrya menší, v posteriorní naopak větší a někdy i vakuolizované. Na posteriorní části embrya může být připojen suspensor (Arditti 1967). Pokud je semeno vyseto na vlhký substrát, může embryo nasáknout vodou a nabobtnat, někdy dochází i k protržení osemení (Smith & Read 2008). Dále se však klíčící rostlinka nedokáže sama vyvíjet, pokud nevejde v kontakt s mykorhizní houbou, která jí dodá potřebné látky. U některých druhů po vysetí na vlhký substrát semeno samo nevyklíčí vůbec (Leake 1994).

6.1.2 Interakce s houbou

Mykorhizně symbiotická asociace orchidejí s houbami byla popsána již na počátku dvacátého století (Bernard 1909). Mladé klíčící rostliny orchidejí nazýváme protokormy. Vzhledem k velmi malým energetickým zásobám, které mají orchidejová semena k dispozici, a absenci chlorofylu jsou protokormy plně závislé na výživě poskytované houbou. Lze je proto označit za obligátně mykoheterotrofní. V pozdějších fázích vývoje se způsob výživy mění. Stále není jasné, zda je většina orchidejí v dospělosti autotrofní nebo zda energii získává takzvaně mixotrofním způsobem. Mixotrofie je kombinovaný způsob výživy, při kterém rostlina pomocí zelených orgánů fotosyntetizuje, jistý podíl organického uhlíku však stále získává z houby (Gebauer & Meyer 2003). Pouze malá část druhů orchidejí (asi 200 druhů) zůstává nezelená, a tedy i plně mykoheterotrofní, po celý život (Leake, 1994).

6.1.3 Výsev orchidejí *in vitro*

Vzhledem ke svým životním specifikům bývají orchideje, vedle klasického pěstování v substrátu, pěstovány *in vitro*, a to jak pro výzkumné i pro komerční účely. Tento způsob nejenže usnadňuje jinak obtížné pěstování orchidejí ze semen, zároveň i umožňuje lepší kontrolu pěstebních podmínek. Existují dva základní způsoby vysévání *in vitro* – symbiotické, kdy se semena vysévají a pěstují společně s houbami, a asymbiotické bez hub. Alternativou k výsevům je vegetativní rozmnožování, které má mnoho podob (přímá regenerace z explantátů, organogeneze *de novo* z tkáňových kultur, somatická embryogeneze aj.) (shrnutí např. v Chugh et al. 2009), tímto způsobem kultivace se ale v této práci dále zabývat nebudu.

6.1.3.1 Symbiotická kultivace

Pro zvláštnosti spojené s klíčením semen bylo v počátcích úspěšné vysévání orchidejových semen velmi obtížné. Ačkoli botanici již v devatenáctém století popisovali a kreslili houbové hyfy pozorované v orchidejových semenáčcích, teprve francouzský vědec Noël Bernard objasnil jejich funkci v klíčení (vyčerpávajicně pojednáno v Yam & Arditti 2009). Sám Bernard již prováděl výsevy semen s houbami (Bernard 1909). Symbiotická kultivace se využívala a využívá dodnes pro výzkum přenosu látek mezi rostlinou a houbou. Dříve se s její pomocí zkoumala i druhová specifita orchideoidně mykorhizních interakcí (Alexander & Hadley 1985; Clements et al. 1986; McKendrick et al. 2002; Stewart & Kane 2006), v umělém systému však kompatibilita symbiontů nemusí odrážet stav věcí v přírodě, proto se dnes tato problematika zkoumá spíše pomocí sekvenování. Symbiotická kultivace má místo i ve snahách o zachovávání vymírajících druhů orchidejí (Zettler 1997; Stewart & Kane 2006) a jejich reintrodukci do přírody, ukazuje se totiž, že symbioticky pěstované rostliny mohou mít větší

klíčivost a jejich semenáčky lepší aklimační schopnosti (Stewart & Kane 2006; Guimarães et al. 2013).

6.1.3.2 *Asymbiotická kultivace*

Symbiotické pěstování orchidejí ze semen bylo od prvních pokusů náročné, mimo jiné kvůli různé specifitě vůči houbovým symbiontům. Proto byl vyvinut způsob, jak symbiózu obejít a umožnit kultivaci orchidejí i bez hub. Tato takzvaná asymbiotická kultivace se provádí přidáním potřebných látek (zejména sacharidů a minerálních látek) přímo do kultivačního média. Poprvé tuto metodu popsal Knudson (1922), který vyvinul i dodnes používané médium Knudson C (viz Rasmussen 1995). Mladé protokormy často potřebují i dodávku jiných organických složek jako jsou vitamíny nebo aminokyseliny, což zřejmě souvisí s nedokonalým anabolismem některých látek (Rasmussen 1995). Některé druhy proto musí být vysévány na komplexní média s obsahem velkého množství různých látek. Takováto média mají většinou proměnlivé složení díky nepřesně definovaným složkám jako je kokosová voda, banánový protlak, extrakt z kvasnic nebo ananasová šťáva (Gonçalves et al. 2012; Ponert et al. 2011; Waes & Debergh 1986). Ani tento způsob však nefunguje pro všechny druhy orchidejí.

6.1.4 **Klíčení orchidejí**

Při klíčení jsou zpravidla jako první rozkládána proteinová tělíska (Manning & van Staden 1987). Následuje velmi specifická degradace zásoby lipidů. Semeno lipidy nevyužívá k tvorbě sacharidů. Odůvodnění není zcela jasné, u druhu *Cattleya aurantica* však byl pozorována absence glyoxyzómů (Harrison 1977). Lipidové zásoby byly v semenáčcích tohoto druhu spotřebovávány pomalu. Lipidová tělíska byla pozorována v těsné asociaci s mitochondriemi. Je proto možné, že látky z degenerujících tělísek vstupují přímo do Krebsova cyklu v mitochondriích. Lipidy by tak zřejmě mohly sloužit jako zdroj energie pro dlouhodobější udržení klíčící rostlinky, dokud nedojde k mykorhizní kolonizaci (Harrison 1977). U druhů *Disa polygonoides*, *Disperis fanniniae* a *Huttonaea pulchra* pěstovaných na médiu bez sacharidů rovněž nebyly nalezeny glyoxyzómy, nedocházelo však ani k degradaci lipidových zásob, částečně byl redukován i rozklad proteinových zásob. Pokud však byly dodány sacharidy, glyoxyzómy se objevily v řádu několika dní, zároveň nastala i degradace lipidových tělísek (Manning & Van 1987). To je v rozporu s dřívějším zjištěním Harrisona (1977), který pozoroval degradaci lipidových tělísek i na médiích bez sacharidů, ačkoli i zde byla rychlost spotřeby lipidů menší než na médiích se sacharidy. Manning a Van Staden (1987) též na rozdíl od Harrisona zjistili v souvislosti se spotřebou lipidů vznik škrobových zrn. Je proto možné, že různé druhy orchidejí jsou schopné s lipidovými zásobami nakládat odlišně za různých

podmínek a používat je k různým účelům. Pro klíčící orchideje je rovněž typická tvorba škrobu, přičemž větší míra jeho akumulace byla pozorována u orchidejí klíčících v podmínkách vyšší dostupnosti cukrů (Rasmussen 1995; Harvais 1974). Zajímavý jev se ukázal na druhu *Goodyera repens*, jejíž asymbioticky pěstované klíčící rostliny ukládaly hodně škrobu a pomaleji rostly, zatímco symbiotické škrob neukládaly a rostly rychle. Navíc, pokud byly na škrob bohaté asymbiotické protokormy infikovány houbou, jejich hladina škrobu rychle poklesla. To by naznačovalo, že houba může potlačovat syntézu škrobu v rostlině (Purves & Hadley 1976).

6.2 Mykorhizní symbióza

Mykorhizní symbióza je označení symbiotického vztahu mezi houbami a rostlinami, který se odehrává v kořenech rostlin. Kolonizované kořeny vytváří specifické útvary, které jsou nazývány mykorhizami. Mykorhizy jsou tradičně děleny na ektomykorhizy a endomykorhizy. V minulosti byly ektomykorhizy popisovány jako takové typy mykorhizy, kde se houbová vlákna omezují na prostor buněčných stěn, tedy apoplastu. Jako endomykorhizy byly označovány mykorhizní symbiózy, ve kterých hyfy apoplast opouštěly a zdánlivě se dostávaly do vnitřního prostoru rostlinných buněk. Ukázalo se však, že endomykorhizní houby sice prorůstají za buněčnou stěnu, nikdy se však nedostávají přes plazmatickou membránu rostlin a v podstatě tedy také zůstávají v apoplastu. Ektomykorhizní houby vytváří v prostoru buněčných stěn husté spletence hyf zvané Hartigova síť. Drtivou většinou rostlin tvořící ektomykorhizy jsou dřeviny. Kromě Hartigovy sítě jsou ektomykorhizy specifikovány rovněž hyfovým pláštěm, jehož vzhled může být využíván pro identifikaci jinak obtížně rozeznatelných houbových kolonizací (Smith & Read 2008).

U endomykorhiz, kde se dostávají hyfová vlákna za buněčnou stěnu rostlinné buňky, vzniká zvláštní rozhraní ohraničené z jedné strany houbovou buněčnou stěnou, z druhé strany rostlinnou plazmatickou membránou. Mezi nimi se vytváří takzvaný mezilehlý prostor (interfaciální matrix) (Scannerini & Bonfante-Fasolo 1983), jehož materiál je zřejmě z velké části rostlinného původu (Balestrini et al. 1996). Plazmatická membrána rostlinné buňky je v těchto místech nazývána membránou perifungální.

Nejrozšířenějším a zřejmě i nejstarším typem endomykorhizní symbiózy je arbuskulární mykorhizní symbióza (AM, dříve nazývaná arbuskulárně vezikulární), jejíž vznik bývá spojován s výstupem rostlin na souš. Podle odhadů ji můžeme naléznout až u více než 80 % suchozemských druhů rostlin (např. Parniske 2008). Dalšími rozlišovanými typy

endomykorhizních asociací jsou erikoidní mykorhizní symbióza, vyskytující se u vřesovcovitých rostlin, monotropoidní mykorhizní symbióza nacházená u podčeledi *Monotropoideae* a orchideoidní mykorhizní symbióza známá pouze z orchidejí (*Orchidaceae*). Kromě ektomykorhizních a endomykorhizních asociací existují i symbiózy, které jsou svým charakterem na půli cesty mezi těmito dvěma formami mykorhizních symbióz. Jde o arbutoidní mykorhizní symbiózu a ektendomykorhizní asociaci (Smith & Read 2008). Protože se tato práce zabývá studiem orchideoidní mykorhizní symbiózy, budu se dále zabývat pouze tímto typem.

6.3 Orchideoidní mykorhizní symbióza

6.3.1 Typy orchideoidní mykorhizy

Jsou rozlišovány dvě odlišné formy orchideoidní mykorhizy: tolypofágní a ptyofágní. U drtivé většiny orchidejí se nalézá forma tolypofágní (Leake 1994), při které hyfy pronikají vrstvou průchozích buněk, jak se označují buňky nejbližší povrchu kořene. Ve vnějších vrstvách kořenové primární kůry začínají hyfy tvořit smotky (pelotony). Tyto buňky se pak nazývají buňky buňky hostitelské, pokud jsou smotky intaktní, nebo stravovací, když jsou již hyfy mrtvé. Toto názvoslovné rozlišení však může být mírně zavádějící, neboť pelotony mohou v buňkách vznikat opakovaně a jedna buňka proto může být střídavě hostitelskou nebo stravovací (Gryndler et al. 2004). Pelotony prochází třemi vývojovými fázemi: intaktní hyfy, degenerující hyfy a shluky hyfových zbytků (Peterson et al. 1996). Ve fázi degenerujících hyf pelotony degradují, zplošťují se a v prostorách rostlinné buňky zůstávají jen pozůstatky pravděpodobně tvořené zbytky houbových buněčných stěn. Kořenová buňka může být poté kolonizována znovu, byly pozorovány buňky kolonizované až čtyřikrát, soudě podle zbytků odumřelých pelotonů (Senthilkumar & Krishnamurthy 1998). K degradaci pelotonů může docházet již po relativně krátké době, pozorována byla již 24 hodin po infekci (Rasmussen 1990). U některých druhů však pelotony zřejmě vydrží podstatně déle, až devět dní, jak uvádí Bougoure et al. (2014). Nejbližší střednímu válci se nachází buňky zásobní, které obsahují množství škrobových zrn, nejsou však kolonizovány houbou.

Pelotony jsou považovány za hlavní místo výměny látek mezi symbionty. V mykorhizních kořenech *Ophrys lutea* byly pozorovány váčky v hostitelských rostlinných buňkách, které by mohly sloužit k endocytóze (Barroso & Pais 1987). Stále však není jasné, zda k přenosu dochází vždy až po rozkladu pelotonu (tzv. nekrotrofní přenos) nebo jestli mohou být některé látky přenášeny již ve stadiu intaktních hyf (tzv. biotrofní přenos). V nedávné době se objevily práce používající pokročilé techniky hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů, které

umožňují sledování izotopových poměrů ve vysokém rozlišení (Bougoure et al. 2014; Kuga et al. 2014). Na protokormech *Spiranthes sinensis* byl tímto způsobem ukázán přenos C a N z živých hyf do rostliny. Bylo však pozorováno i signifikantní zvýšení přenosu těžkých izotopů obou prvků v senescentních pelotonech v porovnání s mladými pelotony (Kuga et al. 2014). Tyto výsledky naznačují, že by přenos látek v orchideoidních mykorhizách mohl probíhat formou biotrofní i nekrotrofní.

Ptyofágní typ orchideoidní mykorhizy byl dosud nalezen jen u malého počtu druhů například z rodů *Gastrodia* a *Galeola* (shrnutí v Smith & Read 2008). Vyznačuje se méně hustými smyčkami ve vnějším kortexu (Leake 1994) a tím, že nejsou stravovány celé smotky jako u tolypofágní mykorhizy, ale jednotlivé hyfy (viz Gryndler et al. 2004). Dlouho byla pro svou výjimečnost tato forma orchideoidní mykorhizy blíže neprozkoumaná. Podrobnější studie byla provedena na orchideji *Gastrodia elata* (Wang et al. 1997). Zde jsou tvořeny hyfové smyčky ve vnějším kortexu, v buňkách nazývaných hostitelské. Tyto smotky houbových vláken však v buňkách přetrvávají, trávení hyf se odehrává až ve vnitřní vrstvě kortexu, v takzvaných buňkách trávicích. Mezi rostlinnými buňkami a hyfami tu vzniká rozhraní, do kterého jsou z rostliny vypouštěny váčky se zřejmě lytickým obsahem. Následně se v rostlinné buňce blízko plazmalemy okolo hyfy vytvoří pravděpodobně endocytotické váčky, které odštěpují menší váčky směrem do rostlinné cytoplazmy, které by mohly sloužit k přenosu materiálu z rozložené hyfy (Wang et al. 1997). Vzhledem k tomu, že se tato forma mykorhizy vyskytuje skutečně vzácně, budu se v dalším textu věnovat pouze běžné tolypofágní formě.

6.3.2 Průběh orchideoidní mykorhizní kolonizace

V dosavadních pracích nebyl pozorován žádný způsob, jakým by byli symbionti k sobě atrahováni. Pokud ale vejdou v kontakt, dochází k pronikání hyf, alespoň v laboratorních kulturách, během několika málo hodin až dní (viz Smith & Read 2008). Kolonizace protokormu se odehrává ve stadiu nabobtnalého embrya, většinou skrze buňky suspensoru (Peterson & Currah 1990; Richardson et al. 1992), odkud postupuje směrem k apexu. U orchidejí není výjimečné, že suspensor chybí. V takovém případě kolonizace probíhá v oblasti bazálního pólu (Pridgeon et al. 2003). V jistých případech může houba pronikat i přes epidermální vlásky (např. Harrison 1977). Hyfy prorůstají přes epidermis do parenchymatických buněk embrya, kde vznikají pelotony (Williamson & Hadley 1970). V pozdějších fázích vývoje rostliny již dochází k mykorhizní kolonizaci v primární kůře kořenů.

Mění se složení matrix v mezilehlém prostoru pelotonů v průběhu jejich vývoje popsal Peterson et al. (1996). Ve fázi degenerujících pelotonů se prostor obohatil o β -1,3-glukany, pektiny a celulózu, které zde v počátku kolonizace nenalezneme. Předpokládá se, že β -1,3-glukany by mohly být pozůstatky houbových buněčných stěn. Rostlinný původ by naopak mohly mít pektiny a celulóza. Příčin, proč komponenty rostlinné buněčné stěny v počátcích kolonizace v interfaciální matrix chybí, může být několik: invadující hyfy mohou produkovat lytické enzymy nebo inhibitory syntézy polysacharidů, plazmalema v oblasti pelotonů se může rozpínat natolik rychle, že se nestací syntetizovat buněčná stěna nebo jsou zkrátka komponenty zde přítomné buněčné stěny natolik odlišné od běžného složení, že nebyly identifikovány (Peterson et al. 1996). Rostliny mohou zřejmě na různé druhy houbových symbiontů reagovat rozdílně. V experimentu s druhem orchideje *Limodorum abortivum* byl pektin nalezen jen na rozhraních s houbou rodu *Ceratobasidium*, na rozhraních s houbou rodu *Russula* nebyl žádný pektin nalezen (Paduano et al. 2011).

Specifické jsou zřejmě rovněž vlastnosti perifungální membrány. Byla pozorována například absence aktivity adenylátcyklázy (Uetake & Ishizaka 1996) nebo aktivita ATPáz, lišící se od okolní plazmatické membrány (Serrigny & Dexheimer 1985). Změny se zřejmě odehrávají i v hostitelské buňce pelotonu. Dearnaley a McGee (1996) pozorovali absenci mikrotubulů v kolonizovaných rostlinných buňkách. Pozdější studie Uetake et al. (1997) naopak ukázala, že mikrotubuly z kolonizovaných buněk nemizí, jsou přítomny zejména v okolí hyf a jádra, buňky ale postrádají typické kortikální mikrotubuly.

6.3.3 Specifita a povaha orchideoidní mykorhizy

Houby účastníci se orchideoidní mykorhizní symbiózy byly dříve známy podle anamorfních stádií, a byly tak rozřazovány do umělých rodů *Rhizoctonia*, *Epulorhiza*, *Ceratorhiza* apod. Později se ukázalo, že se jedná o *Basidiomycota* pocházející z čeledí *Ceratobasidiaceae*, *Tulasnellaceae* a *Sebacinaceae* (Smith & Read 2008). Dále existují i orchideoidně mykorhizní asociace s řadou jiných hub z oddělení *Basidiomycota* a též s některými z *Ascomycota* (např. Bidartondo et al. 2004). Některé orchideje mohou tvořit symbiózu s víceméně různými skupinami hub najednou (takzvané polyfágní druhy orchidejí – např. *Piperia yadonii* a *Tipularia discolor*) (Sharma et al. 2007; McCormick et al. 2004). Oligofágní druhy využívají několika málo hub, často blízké příbuzných. Existují i monofágní rostliny, které tvoří symbiózu jen s jedinou houbou (Rasmussen & Rasmussen 2007). Ve zvláštních případech může fungovat i monofágie sériová, kdy v symbióze figuruje sice jen jedna houba v jednu chvíli, v čase však může být tato vystřídána jinou. To lze vidět např. u druhu *Gastrodia elata*, který klíčí za pomoci *Mycena*

osmundicola, k dokončení životního cyklu však později musí ustavit symbiózu s houbou *Armillaria mellea* (Xu & Guo 2000). Ukazuje se, že ke generalizmu polyfágů mají blíže spíše rostliny zelené (Pellegrino et al. 2016), zatímco k úzce zaměřeným monofágním rostlinám patří převážně obligátně mykoheterotrofní nezelené druhy orchidejí (McKendrick et al. 2002). Ve srovnání s dospělými rostlinami se zdá, že obecně užší spektrum kompatibilních hub mají mladší stádia (semenáčky) (Rasmussen 2002; McCormick et al. 2004).

Houby účastníci se orchideoidní mykorhizy jsou většinou ryze saprofytické, v některých případech ale i ektomykorhizní. Orchideje pak mohou získávat organické látky z ektomykorhizních dřevin skrze mycelium. Tento jev, nazývaný epiparazitizmus, byl zaznamenán například u několika nezelených orchidejí (Warcup 1985; Taylor & Bruns 1997; McKendrick et al. 2002). Později byl pozorován i u mixotrofních zelených orchidejí, jako příklad lze uvést zelený bezlistý druh *Corallorhiza trifida*, který je napojen myceliem ektomykorhizních hub na dřeviny druhu *Betula pendula* a *Salix repens* (McKendrick et al. 2000; Bidartondo et al. 2004).

Ačkoli je orchideoidní mykorhiza na první pohled podobná ostatním endomykorhizám, výrazně se vymyká zejména co do vztahu obou symbiontů. U většiny ostatních mykorhizních asociací lze hovořit o spektru vztahů od mutualismu po parazitizmus, a to zejména v závislosti na okolních podmínkách (Johnson et al. 1997). U orchidejí, alespoň v počátečních stádiích, se však zřejmě díváme na vztah vyloženě parazitický. Zvláště pak proto, že na rozdíl od obligátně symbiotických AM hub tvoří orchideoidní mykorhizu houby, které jsou schopné samostatného života.

6.3.4 Toky látek v orchideoidní mykorhize

6.3.4.1 *Voda a minerální látky*

Pro klíčící orchidej je naprosto zásadní transport vody. Klíčící semena terestrického (*Platanthera intergilabia*) i epifytického (*Epidendrum conopseum*) druhu pěstovaná symbioticky měla vyšší obsah vody než semena vyšetá asymbioticky, přičemž byl tento efekt výraznější u terestrického druhu (Yoder et al. 2000). To by zřejmě mohlo souviset s retenční kapacitou pro vodu, která se liší u semen epifytů a terestritů a která zároveň zřejmě odráží rozdílné podmínky klíčení. Epifytické druhy s hydrofilním osemením a malou retenční kapacitou semene pro vodu jsou pravděpodobně evolučně uzpůsobené na rychlý příjem vody, například během deště. Terestrické druhy mají osemení naopak spíše hydrofobní, umožňující přenos semen po zemi pomocí tekoucí vody, pomalou imbibici a ochranu před vyschnutím.

Díky tomu se semeno s větší pravděpodobností může dostat na místo příznivé pro vyklíčení. Způsob, jakým houba usnadňuje přísun vody k embryu, není zcela jasný. Houba toho může dosáhnout prostým mechanickým narušením osemení, nelze však vyloučit ani možnost přímého získávání vody ze stravovaných pelotonů (Yoder et al. 2000). Bohužel je tato práce se zaměřením na transport vody v orchideoidních mykorhizách velmi ojedinělá, a téma tak není zdaleka dostatečně prokoumáno.

V orchideoidní mykorhize stejně jako v ostatních mykorhizních symbiózách dochází i k toku minerálních látek jako je zejména dusík a fosfor. Příjem fosforu skrze houbového symbionta byl ukázán na semenáčcích druhu *Dactylorchis purpurella* (Smith 1966). Transfer fosforu myceliem do dospělých rostlin orchideje *Goodyera repens* naznačovala již práce Alexander et al. (1984), přesvědčivějších výsledků však dosáhla až studie o více než dvě desítky let později za použití mikrokosmu a radioaktivně značeného fosfátu (Cameron et al. 2007).

Na stejném druhu byl za použití speciálního mikrokosmu pozorován i transport N, který byl v systému poskytován houbovým hyfám ve formě aminokyseliny glycinu dvojitě značené radioaktivním N i C (Cameron et al. 2006). V tomto experimentu byla zjištěna přítomnost obou značených prvků v rostlině, z čehož lze vyvozovat, že N i C dodávané houbou rostlině alespoň částečně pochází z aminokyselin. V jaké podobě a jak se přes mycelium a přes mykorhizní rozhraní aminokyseliny či jejich části dostávají, však zatím jasné není. V tomto kontextu je zajímavé že mycelia ektomykorhizních hub, s kterými asociuje právě i *G. repens*, zřejmě mohou transportovat aminokyseliny vcelku. U houby *Amanita muscaria* byla dokonce izolována aminokyselinová permeáza (Nehls et al. 1999). Příjem N ze značeného glycinu byl ale zaznamenán i u mykorhizní symbiozy tvořené houbami typu *Rhizoctonia*. Tři různé kmeny těchto hub byly zkoumány v asociaci s orchidejí *Cimbidium goeringii*. Experiment naznačil, že příjem N z aminokyselin je závislý na druhu mykorhizní houby (Wu et al. 2013).

6.3.4.2 **Uhlík**

V problematice toku uhlíku v orchideoidní mykorhize můžeme rozlišit dvě základní linie výzkumu. Jednak jde o směr toku uhlíku, jednak o povahu látek přenášených v mykorhizách. Jelikož jsou tyto otázky pro tuto práci klíčové, věnují se jim podrobněji následující dvě podkapitoly.

6.3.4.2.1 **Směr toku**

Při zkoumání směru toku uhlíku je řešena především otázka, nakolik jsou dospělé zelené orchideje autotrofní či heterotrofní. Ke zjišťování míry mykoheterotrofie lze využít

charakteristického obohacení o těžké izotopy ^{13}C a ^{15}N , které vykazují plně mykoheterotrofní rostliny. Houby mají jiné izotopové složení typické vyšším zastoupením právě těchto izotopů. Proto je tento znak mykoheterotrofních rostlin přičítán příjmu C a N z hub (Gebauer & Meyer 2003). Je vysoce pravděpodobné, že stupeň autotrofie u dospělých rostlin je druhově závislý. Stöckel a kolektiv (2014) srovnávali izotopové zastoupení C a N u čtyř druhů: nezelené *Neottia nidus-avis*, částečně mykoheterotrofní *Epipactis helleborine* a dvou druhů, u kterých se v dospělosti předpokládá autotrofie – *Serapias parviflora* a *Pseudorchis albida* (Stöckel et al. 2014). V souladu s očekáváním byly hodnoty obohacení o těžké izotopy dospělých jedinců *S. parviflora* a *P. albida* zřetelně nižší než u *E. helleborine*, nejvyšší hodnoty byly zjištěny u *N. nidus-avis*. Experiment však zároveň poukázal na limity metody izotopového zastoupení. Protokormy *S. parviflora* a *P. albida* byly překvapivě méně obohaceny než protokormy obou dalších druhů. Autoři to přičítají povaze mykorhizních hub. Zatímco *E. helleborine* a *N. nidus-avis* mají za symbionty houby ektomykorhizní, *S. parviflora* a *P. albida* tvoří mykorhizu s houbami saprotrofními. Tyto houby jsou naneštěstí obtížně zkoumatelné a jejich izotopové složení není známo. Je však možné, že jejich izotopové zastoupení ^{13}C a ^{15}N je nižší, což by znamenalo překážku v jednoduchém určování míry mykoheterotrofie (Stöckel et al. 2014). V další nedávné práci byl představen nový způsob zjišťování mykoheterotrofie, pomocí izotopů ^2H (Gebauer et al. 2016). Ty jsou u hub a obecně u heterotrofních organismů zastoupeny poměrně více než u autotrofů. Mezi testovanými druhy byly zastoupeny jak orchideje asociující se saprotrofními houbami, tak s ektomykorhizními houbami. U všech předpokládaných mixotrofů byla zjištěna větší zastoupenost ^2H než u nezelené *N. nidus-avis*. Zdá se tedy, že částečná mykoheterotrofie dospělých orchidejí není jen výsadou rostlin asociujících s ektomykorhizními houbami, ale může se jednat o jev podstatně rozšířenější (Gebauer et al. 2016). Do jaké míry je možné tento fenomén zobecnit se snad ukáže po prozkoumání dalších druhů.

Již před více než čtyřiceti lety se Hadley a Purves pokoušeli experimentálně zkoumat, zda houby v orchideoidní mykorhizní symbióze rovněž získávají nějaké látky. Orchidej *Goodyera repens* pěstovali v atmosféře obsahující radioaktivní oxid uhličitý (CO_2). Práce přinesla negativní výsledky (Hadley & Purves 1974) stejně jako podobný experiment o desetiletí později (Alexander & Hadley 1985). Tuto problematiku se pokoušel rozřešit i Cameron et al. (2006). Experimenty byly opět prováděny na druhu *Goodyera repens*, tentokrát ovšem za použití mikrokosmů zajišťujících lepší kontrolu nad experimentálními podmínkami. Ve dvou studiích byl pozorován tok ^{14}C z dospělých zelených rostlin do hub (Cameron et al. 2006;

Cameron et al. 2008). Stále však jde o pouhý jediný druh orchidejí, u kterého byla takto propracovaná bilance toků C provedena. Zda je situace podobná i u dalších druhů není zřejmé.

6.3.4.2.2 Přenášené látky

Jak již bylo výše zmíněno, jsou v prvních fázích svého života všechny orchideje závislé na výživě od houbového symbionta, tento stav nazýváme jako iniciální mykoheterotrofie (angl. *initial mycoheterotrophy*) (Merckx 2013). Během tohoto období získává rostlina od houby zřejmě podstatnou část živin včetně C. Tok C do protokormu byl experimentálně zjišťován pomocí glukózy značené radioaktivními izotopy C (Smith 1966; Smith 1967). V jaké podobě jsou ale uhlíkaté látky přenášeny z hub do protokormu stále není jasné. Sacharidy jsou jedním z hlavních kandidátů na tuto pozici - již Knudson (1922) pozoroval, že některé sacharidy v asymbiotických médiích jsou pro růst protokormů lepší než jiné. Pomocí asymbiotických výsevů bylo posléze zkoušeno, které látky jsou mladými orchidejemi utilizovatelné. Práce s jednotlivými sacharidy postupně přinesly nejrůznější výsledky, přičemž u některých sacharidů byly pozorovány rozdílné reakce v závislosti na druhu orchideje (viz např. Nakamura 1982; Ernst et al. 1971).

Hybridi orchidejí rodu *Cattleya* rostly nejlépe na médiu s maltózou, média se sacharózou, glukózou a levulózou měla rovněž prospěšný efekt (klesající v tomto pořadí) (La Garde 1929). Při testování širšího spektra sacharidů na rostlinách stejného rodu se ukázaly jako růst podporující zejména manóza, glukóza, maltóza a fruktóza, přičemž s manózou byl růst nejvyšší. O něco méně, ale stále růst podporující byly i sacharóza a rafinóza, naopak média s xylózou, galaktózou, arabinózou a rhamnózou růst nepodporovaly (Wynd 1933). U druhu *Goodyera repens* byl pozorován i pozitivní vliv dextrózy na růst semenáček (Downie 1940). U protokormů rodu *Phalaenopsis* byly jako prospěšné pro růst a diferenciaci shledány glukóza, fruktóza a oligosacharidy z nich složené (sacharóza, trehalóza, celobióza). Na laktóze a melibióze mělo vysoké procento protokormů potíže s diferenciací. Problematickou se ukázala být galaktóza, na které nepřežil žádný semenáček (Ernst et al. 1971). Galaktóza se dá tedy zřejmě označit za sacharid pro orchideje toxický, neboť zastavuje vývoj klíčících semen, jak bylo ukázáno v několika studiích (Wynd 1933; Nakamura 1982; Ernst 1967; Ernst et al. 1971). Již výše zmiňovaná trehalóza, sacharid ve vyšších koncentracích typický pro houby (viz např. review Elbein et al. 2003), podporovala růst protokormů u druhu *Bletilla hyacinthina* a *Dactylorhiza purpurella* (Smith 1973). Jako další sacharid často nalézáný v houbách byl v této práci na stejných druzích testován i manitol. Semenáčky *D. purpurella* rostoucí na manitolu byly v průměru asi o polovinu menší než ty rostoucí na trehalóze, menší byly ale i v porovnání

s protokormy z média bez přidaného sacharidu, které rostly jen omezeně, z malých zásob semene. Ze semen *B. hyacinthina* na manitolu dokonce žádné nedorostlo do stádia tvorby epidermálních vlásků (Smith 1973). Nedávná studie na druhu *Bletia purpurea*, která se zabývala klíčivostí za přítomnosti různých sacharidů, ukázala zvýšenou klíčivost v přítomnosti glukózy, fruktózy, sacharózy i trehalózy, zatímco cukerné alkoholy, manitol a sorbitol, klíčivost oproti variantám bez sacharidů nezvyšovaly (Johnson et al. 2011). Manitol a sorbitol byly testovány znovu na stejném druhu orchideje, tentokrát ale i v interakci se sacharózou a fruktózou (Johnson & Kane 2013). Samotný manitol opět klíčení nepřispíval. Ve vyšších koncentracích však manitol v kombinaci s nízkými koncentracemi sacharózy či fruktózy měl kladný efekt na klíčivost. V nejvyšších koncentracích sacharózy i fruktózy se tento efekt opět ztrácel. Podobný trend byl pozorovatelný i v tvorbě vlásků na protokormech. Sorbitol v nižších koncentracích ani nepodporoval klíčení, ani neinteragoval s působením sacharózy. Ve vyšších koncentracích ale snižoval tvorbu epidermálních vlásků na protokormu (Johnson & Kane 2013). V souvislosti s manitolem jsou zajímavé i výsledky pokusu, v němž byla sledována schopnost nařezaných kousků listů druhu *Bletilla hyacinthina* přijímat ^{14}C značený manitol z roztoku. Manitol byl sice přijímán, zřejmě však nebyl téměř vůbec metabolizován. V listech se akumuloval do koncentrací vyšších, než byla v okolním roztoku (Smith & Smith 1973). Manitol byl testován již i v naší laboratoři. Na družích *Dactylorhiza majalis* a *Ophrys eleonora* byl pozorován jeho příjem v relativně velkém množství oproti ostatním testovaným sacharidům. Manitol však nebyl ani zde zřejmě zpracováván (Ponert 2009; Ponert nepublikováno).

Dalším potenciálním zdrojem C jsou kromě sacharidů i aminokyseliny. Izotopově značené aminokyseliny byly použity již ve výše zmiňovaných pracích s mikrokosmy. ^{13}C byl podáván ve formě značeného glycinu houbám a posléze detekován v pletivech rostlin *Goodyera repens* (Cameron et al. 2006; Cameron et al. 2008). Práce s podzemní orchidejí *Rhizanthella gardneri* a s glycinem obsahujícím ^{13}C a ^{15}N naznačila, že by aminokyselina nemusela být přijímána vcelku – rostliny obsahovaly až pětikrát více ^{15}N než ^{13}C . Sami autoři však zmiňují, že se může jednat o efekt způsobený prodýcháním ^{13}C rostlinou (Bougoure et al. 2010). To by odpovídalo výsledkům studie Camerona a kolektivu, kde byl zaznamenáván i podíl izotopově značeného CO_2 vzniklého při dýchání (Cameron et al. 2008). Příjem aminokyselin v orchideoidních mykorhizách je zkoumán zejména z hlediska příjmu N, který je popsán výše (viz kapitulu 6.3.4.1). Literatura ohledně utilizace aminokyselin orchidejemi je velmi nesourodá a výsledky jsou variabilní. Málokdy však byly aminokyseliny testovány jako samotný zdroj C, spíše byly

přidávány do médií obsahujících již jiný zdroj C (shrnuje v Arditti 1967). Existují však i náznaky, že by aminokyseliny, konkrétně glutamin, mohly být dostatečným zdrojem C i N zároveň (Abualghaith 2012).

6.4 Cukerné alkoholy v rostlinách a houbách

Cukerné alkoholy, někdy nazývané též polyoly, jsou sacharidy, jejichž aldehydická či ketonová skupina je redukována na hydroxylovou. Název polyoly může být trochu zavádějící, protože by se tak přísně vzato mohla nazývat jakákoli látka s třemi či více hydroxylovými skupinami, tedy i cukry samotné. Běžně se však používá právě pro takto redukované látky odvozené od cukrů. Mohou se vyskytovat jak ve formě cyklické (např. inositol), tak acyklické (např. manitol, sorbitol, glycerol). Vyskytují se v rostlinách i v houbách (Bielecki 1982). Jejich význam ve spojitosti s mykorrhizními asociacemi je zatím velmi málo prozkoumaný. V následujícím textu bude stručně pojednáno o jejich výskytu v rostlinách a houbách. Blíže se zaměřím na manitol a sorbitol, kterými jsem se více zabývala i v experimentální části této práce.

Mezi krytosemennými rostlinami je nejčastějším cukerným alkoholem manitol (Lewis & Smith 1967b), dále byl nalezen sorbitol, galaktitol, ribitol, erythritol, allitol, L-iditol, polygalitol, styracitol (Plouvier 1963), perseitol, β -sedoheptitol, oktitol (Charlson & Richtmyer 1960), arabitol, myo-inositol, volemitol, glycerol (Richtmyer 1970). V houbách je nejčastěji zastoupeným cukerným alkoholem rovněž manitol. Dále byly v houbách dosud nalezeny i arabitol, sorbitol, erythritol, xylitol, threitol, volemitol, ribitol nebo glycerol (van Schaftingen & van Laere 1985; Witteveen & Visser 1995; Lewis & Smith 1967b).

Tabulka 1: Vybrané cukerné alkoholy a jejich vzorce

Cukerný alkohol	arabitol	erythritol	glycerol	manitol	sorbitol	xylitol
Vzorec	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$

6.4.1 Manitol

Z chemického hlediska je manitol redukovaná forma manózy. Můžeme jej nalézt u více než 70 čeledí vyšších rostlin, v houbách, lišejnících, bakteriích a řasách, a je proto považován za nejrozšířenější polyol v přírodě vůbec (Loescher 1987; Lewis & Smith 1967b). Jako jeden z hlavních sacharidů funguje zejména v čeledích *Scorophulariaceae*, *Rubiaceae* (Bielecki 1982),

Oleaceae (Pirson & Zimmermann 1975) a *Apiaceae* (Prata et al. 1997). V rostlinách celeru (*Apium graveolens*) může tvořit až 50 % floémem transportovaných sacharidů (Loescher et al. 1995). V rostlinách zastává manitol hned několik funkcí najednou. Může sloužit jako skladovací či transportní sacharid (Bielecki 1982; Prata et al. 1997; Fellman & Loescher 1987; Rumpho et al. 1983) nebo jako zásobárna elektronů pro redukci, neboť při metabolismu manitolu enzymem manitoldehydrogenázou dochází k redukci NAD (Loescher 1987; Stoop & Pharr 1992). Rovněž má vlastnosti zhášecí kyslíkových radikálů (angl. *reactive oxygen species*, ROS): byla ukázána schopnost manitolu zabránit jejich aktivitě jak *in vitro* (Smirnoff & Cumbe 1989; Shen et al. 1997a), tak *in vivo* (Shen et al. 1997b). Kromě toho zřejmě působí i jako osmoprotektant – jeho hydroxylové skupiny mohou při nedostatku vody nahrazovat molekuly vody, a chránit tak proteiny a membrány před poškozením (Yancey et al. 1982). Transgenní rostliny lilkovitých s vneseným bakteriálním genem pro manitol-1-fosfátdehydrogenázu, která se podílí na tvorbě manitolu, byly shledány odolnějšími vůči osmotickému stresu způsobenému chladem, zasolením a suchem (Prabhavathi et al. 2002; Rahnama et al. 2011; Tarczynski et al. 1993).

Metabolismus manitolu byl zkoumán zejména na celeru, kde tvoří velkou část asimilátů. Zpracování manitolu probíhá pomocí enzymu manitoldehydrogenázy (MDH), která je závislá na NAD. Její aktivita ústí v oxidaci manitolu na manózu (Williamson 2002). Expres MDH je negativně ovlivňována hexózami (Prata et al. 1997) a vysokou salinitou (Stoop et al. 1996). To umožňuje za normálních podmínek využívat jako zdroj energie spíše hexózy, přičemž manitol zastává přednostně funkci osmoprotektantu. MDH může být exprimována i v rostlinách, které manitol neprodukují, zde pravděpodobně funguje v obraně proti patogenům (Jennings 2000, viz dále).

Manitol je nejčastěji zastoupeným cukerným alkoholem v houbách (Lewis & Smith 1967b). Jsou mu přisuzovány nejrůznější funkce. Patří mezi ně zejména funkce zásobního sacharidu (Corina & Munday 1971), podíl na odolnosti k abiotickému stresu (Ruijter et al. 2003) a role při uvolňování a rozšiřování spor (účastní se tvorby takzvané Bullerovy kapky, která umožňuje odmrštění spor) (Webster et al. 1986). V závislosti na popsání takzvaného manitolového cyklu v houbách byl vyvozován i význam manitolu jako zdroje redukční síly pro tvorbu NADPH (Hult & Gatenbeck 1978; Hult & Gatenbeck 1979; Hult et al. 1980). S odhalením nových metabolických drah v houbách byl význam manitolového cyklu v poslední době zpochybněn (viz Patel & Williamson 2016).

Na druhou stranu se nedávno vynořila další role manitolu v houbách, která v současnosti získává pozornost badatelů. Některé fytopatogenní houby totiž pravděpodobně pomocí manitolu zneškodňují ROS, které rostlina tvoří v takzvaném oxidativním vzplanutí na svou obranu (Williamson 2002; Jennings et al. 1998). Bylo ukázáno, že exprese MDH v rostlině se zvýší po přidání houbového elicitoru (Jennings 2000). To by bylo možné považovat za odpověď rostliny na záplavu houbového manitolu, který by jinak snížil účinnost rostlinné obrany (Jennings 2000). Naopak produkce manitolu může být v houbách navozena přidáním rostlinného extraktu, jak bylo ukázáno na fytopatogenních houbách *Alternaria alternata* a *Ceroaspora nicotianae* (Jennings et al. 1998). Mimo to mutanti *A. alternata* s poškozenou tvorbou enzymu manitol-1-fosfátdehydrogenázy, kteří nedokázali tvořit manitol, měli sníženou patogenicitu (Véléz et al. 2008).

6.4.2 Sorbitol

Sorbitol, někdy nazývaný glucitol, je redukována forma glukózy. Funguje jako hlavní produkt fotosyntézy a přenášený sacharid v čeledi *Rosaceae*, kde představuje více než 50 % C transportovaného z listů a může tvořit až 10 % čerstvé hmotnosti jejich plodů. Najdeme ho proto hojně v plodech jabloně (rod *Malus*), hrušně (rod *Pyrus*) či slivoně (rod *Prunus*), které jsou ekonomicky významné (Loescher 1987). Ve větší míře se vyskytuje i v rostlinách čeledi *Plantaginaceae* (Briens & Larher 1983).

Podobně jako manitol se sorbitol zřejmě podílí na osmotickém přizpůsobení – při nedostatku vody poklesá aktivita enzymu rozkládajícího sorbitol a dochází k akumulaci sorbitolu (Lo Bianco et al. 2000). Stejně jako v případě manitolu i při zpracování sorbitolu dochází ke vzniku NADH a sorbitol proto může fungovat jako zásobárna redukční síly (Morandi et al. 2008). Rovněž byla zaznamenána schopnost sorbitolu zhášet hydroxylové radikály (Smirnoff & Cumbes 1989). Přesto ne vždy musí pro rostliny více sorbitolu znamenat lépe. Transgenní rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum*) s vneseným genem pro sorbitol-6-fosfátdehydrogenázu, která je enzymem syntézy sorbitolu, jej skutečně akumulovaly, rostlinám s vyšším obsahem sorbitolu však vznikaly na listech nekrotické léze, v extrémních případech nebyly tabáky schopné tvořit kořeny. Podle autorů studie nadměrná produkce sorbitolu narušila syntézu inositolu a způsobila osmotickou nerovnováhu (Sheveleva et al. 1998).

Metabolismus sorbitolu zajišťuje enzym sorbitoldehydrogenáza (SDH), která je NAD dependentní a katalyzuje oxidaci sorbitolu na fruktózu (Loescher 1987). Geny kódující SDH byly nalezeny i v rostlinách, které sorbitol neakumulují, například v huseníčku (*Arabidopsis*

thaliana) (Aguayo et al. 2013) nebo v rajčeti (*Lycopersicon esculentum*) (Ohta et al. 2005). Při zkoumání substrátové specifity enzymu se ukázalo, že SDH izolovaná z plodu japonské hrušky (*Pyrus serotina*) je schopna oxidovat sorbitol, L-identol, xylitol a L-threitol, ne však ribitol a L-arabitol (Oura et al. 2000). Částečně odlišné výsledky přineslo testování SDH z asijské švestky (*Prunus salicina*), který rovněž oxidoval sorbitol a xylitol, zároveň však i L-ribitol a manitol. Další polyoly, mezi kterými byl i arabitol, erythritol, glycerol nebo galaktitol, enzym neoxidoval (Guo et al. 2012). SDH z *A. thaliana* dokázala jako substrát využívat sorbitol, ribitol a xylitol, ostatní polyoly byly oxidovány v podstatně menší míře (arabitol, manitol, laktitol, maltitol, erythritol – v tomto pořadí od nejvíce k nejméně oxidovanému) (Aguayo et al. 2013). Zajímavé je, že druhy, které sorbitol nevyužívají jako transportní sacharid, vykazují větší relativní schopnost SDH oxidovat ribitol v poměru k schopnosti oxidovat sorbitol. Naopak SDH rostlin z čeledi *Rosaceae* silně preferují sorbitol a ostatní cukerné alkoholy jsou oxidovány výrazně méně (viz Aguayo et al. 2015).

Sorbitol byl nalezen i v houbách ačkoli v podstatně menší míře než manitol (Lewis & Smith 1967a). Zaznamenán byl například ve vegetativním myceliu houbové rzi *Puccinia graminis* (MacLean & Scott 1976) nebo ve fytopatogenní houbě *Pyrrenochaeta terrestris* (Wright & Le Tournau 1965). V houbě *Aspergillus niger* byla identifikována i sorbitoldehydrogenáza, kmen s deletovaným genem nedokázal růst na médiu se sorbitolem (Koivistoinen et al. 2012). Sorbitol (společně s xylitolem) byl rovněž testován na schopnost ovlivňovat klíčení a růst hub za rozdílných podmínek teploty a vodní aktivity. Působení na kinetiku růstu bylo závislé na konkrétním druhu houby. V některých podmínkách a u některých hub sorbitol podporoval klíčení či růst. Zajímavý byl pak zejména efekt pozorovaný na houbě *Penicillium chrysogenum*, jejíž klíčení bylo přítomností sorbitolu stimulováno hlavně v suboptimálních podmínkách. Autoři hypotetizují, že by se mohlo jednat o projev sorbitolu jako kompatibilního solutu, který dokáže podpořit klíčení za stresových podmínek nedostatku vody (Patriarca et al. 2011). Při zkoumání účinku navozeného vysokou koncentrací sorbitolu, bylo zaznamenáno pouze malé, nesignifikantní zvýšení růstu (Górka-Nieć et al. 2010). Byla však pozorována změna morfologie hub a zvýšená tvorba glycerolu v myceliu, která zřejmě měla vyrovnat vysoký osmotický tlak zvnějšku. Buněčné stěny hub rostoucích ve vysoké koncentraci sorbitolu byly náchylnější k degradaci hydrolytickými enzymy, změněno bylo i složení buněčných stěn. To by mohlo být způsobeno nedostatkem prekurzorů pro tvorbu buněčné stěny zapříčiněným nadměrnou tvorbou glycerolu. Houby měly navíc i sníženou produkci proteinů, zejména byla snížena exprese proteinů celohydrobiohydrolázy I a II, které za normálních

okolností tvoří velkou většinu sekretovaných proteinů. Změněná byla i glykosylace proteinů, zároveň se ukázala snížená exprese dolichylfosfátmanózasyntázy, která se podílí na obou typech glykosylace (O- i N-). Tyto změny by mohly být rovněž zapříčiněny nedostatkem glukózy, která je spotřebovávána na tvorbu glycerolu (Górka-Nieć et al. 2010). Většina prací zabývajících se sorbitolem v houbách byla prováděna pouze v laboratorních podmínkách, jaká je role a význam sorbitolu v houbách za přirozených podmínek tak není jasné.

7 Materiál a metody

7.1 Kultivace rostlinného materiálu

7.1.1 Kultivační prostory

Klíčící semena byla kultivována v tmavých plastových krabicích, větší rostliny na světle s 16h fotoperiodou, obojí při teplotě 19-24 °C.

7.1.2 Kultivační média

7.1.2.1 Složení a příprava

Pro výsev semen a kultivaci protokormů bylo použito SMS médium (Tabulka 2; Ponert et al. 2009) s přidáním vždy jednoho nebo dvou sacharidů či glutaminu nebo komplexní médium 1/4-2 (Tabulka 3; Ponert et al. 2011). Pro pěstování starších rostlinek bylo použito komplexní médium MO2 (Tabulka 4; Ponert et al. 2011). Na symbiotické výsevy bylo použito modifikované médium OMA (Tabulka 6; Perotto et al. 2014; Ercole et al. 2015).

Tabulka 2: Složení SMS média

Složka	Množství na 1 l
RAM3_A (Tabulka 7)	20 ml
MS-B (Tabulka 10)	2 ml
Fe (Tabulka 8)	2 ml
MS-D (Tabulka 11)	2 ml
casein enz. hydrolyzát	2 g
kyselina citrónová	0.15 g
aktivní uhlí	0.5 g
sacharid	viz Tabulka 24
agar	7 g

Tabulka 3: Složení 1/4-2 média

Složka	Množství na 1 l
MS-A	12.5 ml
MS-B	1.25 ml
Fe	1.25 ml
MS-D	1.25 ml
pangamin	0.45 g
casein enz. hydrolyzát	1 g
ananas	20 ml
sacharóza	15 g
aktivní uhlí	0.5 g
kinetin	2 mg
agar	7 g

Tabulka 4: Složení MO2 média

Složka	Množství na 1 l
MS-A (Tabulka 9)	1 ml
MS-B	1.25 ml
Fe	1.25 ml
MS-D	1 ml
Mo (Tabulka 12)	25 ml
pangamin	0.9 g
yeast extract	1.4 g
casein enz. hydrolyzát	1 g
ananasová šťáva*	10 ml
sacharid	viz Tabulka 5
aktivní uhlí	0.5 g
kinetin	2 mg
agar	7 g

*ananasová šťáva připravena vymačkáním z plodu ananasu, který byl oloupán a nakrájen (nebyl použit tužší střed plodu), šťáva skladována v -20 °C

Tabulka 5: Množství sacharidů pro varianty MO2 média

Sacharid	Molární koncentrace	Množství na ¼ l
D-manitol	346mM	3.992 g
D-manitol	173mM	1.996 g
D-sorbitol	346mM	3.992 g
D-sorbitol	173mM	1.996 g

Tabulka 6: Složení OMA média, médium se připravuje bez úpravy pH

Složka	Množství na 1 l
mleté ovesné vločky	3 g
agar	10 g

Všechna média byla připravena za stálého míchání postupným přidáváním jednotlivých složek do malého objemu destilované vody. Výsledného objemu bylo dosaženo přidáním odpovídajícího množství destilované vody. Nakonec bylo upraveno pH pomocí 1M KOH a HCl na hodnotu 5,8 (pokud není u konkrétního média uvedeno jinak). Média byla sterilizována v autoklávu (20 min, 120 °C, 1,5 kPa). Všechny složky byly přidávány před autoklávováním.

7.1.2.2 Zásobní roztoky do médií

Tabulka 7: Složení RAM3_A roztoku – skladován v chladničce

Složka	Množství na 1 l
Ca ₃ (PO ₄) ₂	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4 g

Tabulka 8: Složení Fe roztoku – obě složky rozpouštěny odděleně ve 200 ml destilované vody, zahřáty na zhruba 80 °C, roztok FeSO₄·7H₂O přiléván za stálého míchání do roztoku Na₂EDTA·2H₂O, mícháno až do vychladnutí a doplněno destilovanou vodou do výsledného objemu, skladován při -20 °C

Složka	Množství na 500 ml
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.78 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	3.73 g

Tabulka 9: Složení MS-A roztoku – skladován v chladničce

Složka	Množství na 1 l
NH ₄ NO ₃	33 g
KNO ₃	38 g
CaCl ₂	6.62 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.4 g
KH ₂ PO ₄	3.4 g

Tabulka 10: Složení MS-B – skladován při -20 °C

Složka	Množství na 500 ml
KI	0.083 g
H ₃ BO ₃	0.620 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.69 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.860 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.5 mg
CoCl ₂	1.3 mg

Tabulka 11: Složení MS-D – skladován při -20 °C

Složka	Množství na 500 ml
insitol	10 g
kyselina nikotinová	50 mg
pyridoxin – HCl	50 mg
thiamin – HCl	50 mg
glycin	0.2 g

Tabulka 12: Složení Mo roztoku – skladován v chladničce

Složka	Množství na 1 l
KH ₂ PO ₄	2.8 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.8 g
CaCl ₂	2 g

7.1.3 Výsevy semen

7.1.3.1 Původ a skladování semen

Semena *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) P. F. Hunt & Summerh. a *Anacamptis morio* (L.) R. M. Bateman, Pridgeon & M. W. Chase pocházela z rostlin pěstovaných v hrnkové kultuře v Botanické zahradě Hl. m. Prahy (kultura založena z výsevu semen z lokality PP Rádlo, okres Jablonec nad Nisou). Semena byla sbírána zralá. Po přečištění byla uložena v papírových sáčkách v uzavřené nádobě se silikagelem. Skladována byla při pokojové teplotě ve tmě.

7.1.3.2 Desinfekce a výsev

Semena byla desinfikována v injekční stříkačce s kouskem nylonové sítky vloženým mezi jehlu (1.2 x 40 mm) a ústí stříkačky. Pro lepší smáčivost povrchu byla semena nejprve ošetřena 70% etanolem (4 min). Poté byla třikrát promyta sterilní destilovanou vodou. Samotná desinfekce byla provedena roztokem chlórového vápna (5 min). Nakonec byla semena opět dvakrát promyta sterilní destilovanou vodou, po třetím nabrání ve vodě zůstala. Roztok chlórového vápna byl připravován smícháním 10 g chlórového vápna (Kittfort) s 50 ml destilované vody. Po hodině odstání byl přefiltrován a byla k němu přidána kapka smáčedla TWEEN 20. Roztok byl vždy připravován čerstvý, těsně před sterilizací. Po sterilizaci byla z injekční stříkačky odstraněna nylonová síťka a jehla byla vyměněna za novou, sterilní jehlu s větším průměrem (1.8 x 30 mm), kterou byla suspenze semen ve vodě vysévána na misky s médiem. Semena byla vysévána ihned po sterilizaci. Při symbiotických výsevech byla do středu Petriho misky s vyšetými semeny umístěna kostička média vyříznutá z Petriho misky s napěstovanými houbami. Desinfekce i výsev semen probíhaly ve sterilním prostředí laminárního flow-boxu.

7.1.3.3 Sklizení vyklíčených protokormů

Sklizení probíhalo po třech nebo čtyřech měsících od výsevu. Protokormy byly před sklizením vyfotografovány (fotoaparát Canon 760D, objektiv Canon Macro Lens EF 100mm USM 1:2:8). Aby bylo možné využít fotografie nejen pro zjišťování klíčivosti, ale i pro obrazovou analýzu velikosti protokormů a vyklíčených semen, byly fotografie pořizovány pomocí stativu, vždy ze stejné vzdálenosti od povrchu média na misce. Všechn rostlinný materiál (protokormy, vyklíčená i nevyklíčená semena) byl přenesen z Petriho misek do předem zvážných mikrozkuvek a po zjištění hmotnosti ihned zmražen tekutým dusíkem. Vzorek byl vždy vytvořen z jedné nebo více misek tak, aby jeho čerstvá hmotnost byla v rozmezí 33 – 200 mg pro účely měření na HPLC, 35 – 60 mg pro izolaci RNA. Do dalšího zpracování byly vzorky skladovány v - 80 °C. Pro účely přípravy vzorků pro HPLC měly mikrozkuvky

otvory ve víčku, pro přípravu vzorků na izolaci RNA byl materiál zmražen v mikrozkušavkách spolu se sterilními kovovými kuličkami.

7.1.4 Kultivace starších rostlin

Starší rostliny byly pěstovány za účelem izolace RNA. Osmnáct měsíců staré rostliny *Dactylorhiza majalis* byly přesazeny z SMS média na M02 médium. Pro izolaci RNA byly z rostlin odebírány vzorky pomocí skalpelu do předem zvážených mikrozkušavek se sterilními kovovými kuličkami, po zvážení byly vzorky okamžitě zmrazeny v tekutém dusíku a ihned zpracovány nebo skladovány v -80 °C.

7.2 Práce s *Escherichia coli*

Pro práci byly použity bakterie *Escherichia coli*, kmen JM109. Bakterie byly dlouhodobě skladovány v hluboce zmraženém stavu.

7.2.1 Média a kultivace

Při práci byly bakterie kultivovány na LB médiu (Tabulka 13) s kanamycinem (50 mg/l). Bakterie byly pěstovány ve tmě při 37 °C na Petriho miskách otočených dnem vzhůru, aby se kolonie nerozmyly skapávající vysráženou vlhkostí.

Tabulka 13: Složení LB media, sterilizováno klávkováním

Složka	pepton	yeast extract	NaCl	(agar)
Množství na 1 l	10 g	5 g	10 g	17.5 g

7.2.2 Transformace bakterií

40 µl suspenze kompetentních bakterií bylo rozmrazeno na ledu. K nim bylo přidáno 2 µl ligační směsi s transformovaným plazmidem. Po minutové inkubaci na ledu byla směs přepipetována do elektroporační kyvety. Pomocí elektroporačního přístroje Eppendorf Eporator byl pak na směs aplikován krátký elektrický puls o napětí 2500 V. Poté byl k suspenzi buněk urychleně přidán 1 ml SOC média (Tabulka 14), kterým byly bakterie vypláchnuty do zkumavky. Po hodinovém třepání (180 rpm) ve 37 °C byly bakterie vysety na Petriho misky s LB médiem s kanamycinem a uloženy do 37 °C. Druhý den byly jednotlivé kolonie ve sterilním prostředí přečárkovány na nové misky se stejným médiem a po dni kultivace uloženy až do další práce v chladničce.

Tabulka 14: Složení SOC média, sterilizováno filtrací

Složka	pepton	yeast extract	glukóza	NaCl	KCl	MgCl ₂	MgSO ₄
Množství na 1 l	20 g	5 g	3.60 g	0.58 g	0.19 g	0.95 g	1.20 g

7.2.3 Příprava kompetentních bakterií

Práce probíhala ve sterilním prostředí laminárního flow-boxu. Bakterie byly přečárkovány na Petriho misku s LB médiem tak, aby narostly oddělené kolonie. Po půli dne kultivace při 37 °C byly samostatné kolonie přeočkovány do 50 ml tekutého LB média ve sterilních baňkách. Po šesti hodinách kultivace při 37 °C za třepání při 180 rpm bylo 5 ml suspenze buněk zaočkováno do 200 ml tekutého LB. Bakterie byly stejným způsobem kultivovány až do dosažení optické denzity 0.6 při 600 nm. Poté byly baňky s bakteriemi přeneseny do ledové lázně a 15-30 minut za občasného míchání chlazeny. Následně byly přeneseny po 25 ml do vychlazených centrifugačních zkumavek a 10 minut centrifugovány v chlazené centrifuze při 4 °C a 4000 rpm. Po slití supernatantu a resuspendování v 6 ml sterilní destilované vody byly bakterie přeneseny do další vychlazené zkumavky a dále uchovávány na ledu. Poté bylo znovu přeneseno dalších 25 ml bakteriální kultury do zkumavek a stejným způsobem centrifugováno. Sediment pak byl resuspendován ve 34 ml sterilní destilované vody, k nimž bylo pak přidáno 6 ml již dříve resuspendovaných bakterií. Těchto 40 ml bylo opět centrifugováno 10 minut. Po slití supernatantu byly bakterie resuspendovány v 25 ml sterilního vychlazeného 10% glycerolu. Směs byla znovu centrifugována 10 minut, supernatant byl posléze slit. Sediment byl resuspendován v 1 ml vychlazeného sterilního glycerolu. Po dalším kole centrifugace a odstranění supernatantu byly bakterie resuspendovány ve sterilním vychlazeném GYT médiu (viz Tabulka 15), (100 µl/1 ml bakterií). Posléze byla změřena optická denzita stokrát zředěného roztoku a podle ní byl původní (neředěný) roztok naředěn na koncentraci 2×10^{10} – 3×10^{10} buněk/ml (přičemž $1.0 \text{ OD}_{600} \sim 2.5 \times 10^8$ buněk/ml). Suspenze byla rozdělena po 40 µl do sterilních mikrozkušavek v ledové lázni, zmrazena v tekutém dusíku. Bakterie byly uchovávány v -70 °C.

Tabulka 15: Složení GYT média, bez úpravy pH, sterilizováno filtrací přes 0.22 µm filtr, skladováno ve 4 °C

Složka	Množství na 10 ml
100% glycerol	1 ml
pepton	0.0125 g
yeast extract	0.025 g
destilovaná voda	doplněna do výsledného objemu

7.3 Analýza vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

7.3.1 Příprava vzorků pro zjištění obsahu rozpustných sacharidů

Zmražené vzorky se známou čerstvou hmotností rostlinného materiálu byly lyofilizovány půl dne v lyofilizačním zařízení Lyovac GT 2. Zvážením byla zjištěna jejich suchá hmotnost. Ke každému vzorku bylo přidáno 0.5 ml 80% metanolu, ve kterém byly inkubovány v 75 °C po dobu 15 minut. Metanol byl následně odpařen ve vakuovém koncentrátoru (Eppendorf Concentrator Plus, 3 h, 45 °C, program V-AL). Podle hmotnosti sušiny pak bylo k odpařeným vzorkům přidáno odpovídající množství demineralizované vody (Tabulka 16).

Tabulka 16: Množství přidané demineralizované vody pro analýzu rozpustných sacharidů

Suchá hmotnost vzorku	Objem přidané demineralizované vody (MilliQ)
< 1 mg	0.2 ml
1 - 5 mg	0.3 ml
5 - 10 mg	0.5 ml
10 - 20 mg	1.0 ml
20 - 30 mg	1.5 ml

Poté byly vzorky inkubovány po dobu 15 minut v ultrazvukové lázni Sonorex, která byla následována centrifugací (Eppendorf Centrifuge 5415D, 16 100 rcf, 10 min) a přefiltrováním supernatantu přes membránové nylonové filtry (velikost pórů 0.22 µm). Hotové vzorky byly do měření na HPLC skladovány v - 20 °C nebo - 80 °C.

7.3.2 Příprava vzorků pro zjištění obsahu škrobu

Pelety zbylé z přípravy vzorků pro analýzu rozpustných sacharidů byly třikrát promyty tímto postupem: přidání 1 ml demineralizované vody, zvortexování, 15 minut v ultrazvukové lázni, 10 minut centrifugace (16 100 rcf, 10 min), odsátí supernatantu. Po promytí bylo k vzorkům přidáno 0.5 ml 0.1M Na-acetátového pufru (Tabulka 17), se kterým byly zkládvány (20 min, 120 °C, 1,5 kPa). Po vychladnutí na pokojovou teplotu a následném zchlazení v chladničce na 4 °C byly vzorky přes noc inkubovány se 100 µl enzymatického roztoku štěpícího škrob (30 U α-amylázy a 60 U amyloglukosidázy na jeden vzorek, rozpuštěno v Na-acetátovém pufru) při 40 °C.

Tabulka 17: Složení Na-acetátového pufru

Roztok A: 0.2M CH ₃ COOH
Roztok B: 0.2M HCl
Roztok B přikapáván do roztoku A až do dosažení pH 4.5.

Enzymy byly inaktivovány 5 min při 95 °C. Vzorky pak byly vysušeny ve vakuovém koncentrátoru (3 h, 60 °C, program V-AQ). Následně bylo ke vzorkům přidáno odpovídající množství demineralizované vody (Tabulka 18).

Tabulka 18: Množství přidané demineralizované vody pro analýzu škrobu

Suchá hmotnost vzorku	Objem přidané demineralizované vody
< 5 mg	0.2 ml
5 - 10 mg	0.3 ml
10 - 20 mg	0.5 ml
20 - 30 mg	1 ml

Vzorky byly inkubovány 15 minut v ultrazvukové lázni a 10 minut centrifugovány (16 100 ref, 10 min). Supernatant byl přefiltrován přes membránový filtr (velikost pórů 0.22 µm) do čistých mikrozskumavek. Do měření na HPLC byly vzorky uchovávány při - 20 °C.

7.3.3 HPLC

Analýza vzorků probíhala pomocí HPLC s refraktometrickou detekcí.

Parametry systému: refraktometrická detekce (Shodex RI-101), pumpa DeltaChrom™ SDS 030 (Watrex), teplota 80 °C, integrace v programu Clarity (verze 5.0.4.158), předkolonka - polymer IEX 8 µm Pb²⁺ (Watrex), kolona 250 x 8 mm (Watrex) – polymer IEX 8 µm Pb²⁺ (pro rozpustné sacharidy), polymer IEX 8 µm Ca²⁺ (pro škrob), eluent – demineralizovaná voda (MilliQ), rychlost průtoku 0.5 ml·min⁻¹, objem vpichovaného vzorku 50 µl.

7.4 Práce s nukleovými kyselinami

7.4.1 Izolace cDNA

7.4.1.1 *Izolace RNA*

Z odebraného rostlinného materiálu byla pomocí NucleoSpin RNA Plant kitu (Macherey-Nagel) nebo RNeasy Plant Mini Kitu (Quiagen) izolována celková RNA podle protokolu výrobce. Koncentrace získané RNA byla změřena na spektrofotometrickém přístroji NanoDrop 2000. Při použití NucleoSpin RNA Plant kitu bylo štěpení DNA provedeno na kolonce během izolace DNA. Při použití RNeasy Plant Mini Kitu bylo štěpení DNA provedeno v roztoku. Množství vyizolované směsi odpovídající 1 µg RNA bylo doplněno na objem 8.5 µl. Dále byla přidány složky pro rozštěpení DNA (Tabulka 19). Směs byla inkubována 30 min při 37 °C. Poté byla přidána 1 µl 25mM EDTA, s kterou byla směs inkubována v 65 °C po dobu 10 min, čímž došlo k inaktivaci DNázy.

Tabulka 19: Složení premixu pro 10µl reakci k rozštěpení DNA

DNÁza 1	Inhibitor RNáz RiboLock	10x reakční pufr s MgCl ₂
1 µl (1 u/µl)	0.5 µl	1 µl

7.4.1.2 Reverzní transkripce

0.5 µg RNA bylo smícháno s 1 µl oligo-T primeru, po doplnění objemu na 11 µl pak byla směs inkubována 5 minut při 70 °C, aby došlo k rozvolnění případných vlásenek tvořených molekulami RNA. Dále byly přidány 4 µl RT pufru, 2 µl deoxynukleotidů (dNTPs) a 0.5 µl inhibitoru RNáz RiboLock a směs byla inkubována 5 minut ve 41 °C. Po přidání reverzní transkriptázy Revert Aid RT (Fermentas) byla směs inkubována 1 hodinu ve 42 °C. Během 10 minut při 70 °C pak došlo k rozložení reverzní transkriptázy.

7.4.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

7.4.2.1 Navrhování primerů

Podle genů sorbitoldehydrogenázy a manitoldehydrogenázy z jednoděložných rostlin (*Musa acuminata subsp. malaccensis*, *Phoenix dactylifera*, *Elaeis guineensis*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Setaria italica*, *Oryza brachyantha*) byly vyhledány homologní sekvence v orchidejových genomových databázích Orchidstra (Su et al. 2013) a OrchidBase (Fu et al. 2011) pomocí programu BLAST (Madden 2003). Na konzervované úseky byly navrženy primery pro PCR.

Primery byly navrhovány podle konzervovaných úseků homologních sekvencí genů sorbitoldehydrogenázy a manitoldehydrogenázy z příbuzných orchidejí podčeledi *Epidendroideae* (primerové páry Sor1, Man1, Man2, Man3). Poté co se ukázaly pro geny *D. majalis* neúčinné, byly navrženy nové primery podle konzervovaných homologických úseků z druhu *Ludisia discolor* (Ker Gawl.) A. Rich. Tento druh je *D. majalis* fylogeneticky bližší, neboť jsou oba druhy z podčeledi *Orchidoideae* (primerové páry Sor2 a Man4). V případě manitoldehydrogenázy nebyly ani takto získané primery účinné, protož byly navrženy nové primery do nejvíce konzervovaných úseků proteinových sekvencí orchidejí (primerový pár Man5). Takto získané primery se ale také ukázaly jako nefunkční. Dále tedy pokračovala pouze práce se sorbitoldehydrogenázou. Po namnožení úseku genu v PCR byl produkt rozdělen elektroforézou, izolován, transformován do *E. coli* a osekvenován. Podle sekvence sorbitoldehydrogenázy pak byly navrženy přesné primery Sor3.1. Všechny primery byly vyrobeny firmou Generi Biotech. Seznam použitých primerů je v Tabulka 20. Navrhování primerů probíhalo za pomoci programu BioEdit (verze 7.2.5), MEGA (verze 6.0, Tamura et al. 2013) a on-line nástroje Primer-BLAST.

Tabulka 20: Seznam použitých primerových párů (poslední písmeno názvu značí přímé (forward, f) a zpětné (reverse, r) primery)

Název	Sekvence (od 5' konce k 3' konci)
Sor1f Sor1r	AGCTCCAACCACTTGGTCC GCAACACTAAGGGGCTCACA
Sor2f Sor2r	AAGGCTGTGGGCATCTGTGGC AATGCTTCCTCGACCTCCTTCTG
Sor3.1f Sor3.1r	ACACGAGTGTGCTGGTGTAT CCGGCGCAATCGAATGTTAT
Man1f Man1r	CCAGAAGAGCCACTGACGAA TCCTTTGATGCTCCAAGCACT
Man2f Man2r	GTTGGCTCCTGCAACGAATG GGTGCAATTCAGCCACAAC
Man3f Man3r	CGGAAGGCATTTCGGTTAGC TCTGCATCAGCTGAGGATCG
Man4f Man4r	ATACTCTACTGTGGAATCTGTAC TATAAACAGTGATGCCGGCACAG
Man5f Man5r	TCAAACCTGGGGACAAGGC GTGTCTTTCATTCCGCCAATG
Actin_F Actin_R	GGCTAACAGAGAGAAGATGACC AATAGACCCTCAATCCAGAC

7.4.2.2 Polymerázy

Na většinu pokusů byla použita DreamTaq (Thermo Fisher Scientific) polymeráza, jejíž produkty jsou snadno klonovatelné, neboť tvoří 3' A koncové přesahy. Pro získání přesné sekvence byla užita polymeráza HotStar HiFidelity Polymerase (Quiagen), která má kontrolní „proofreading“ aktivitu, a je tedy přesnější. V případě této polymerázy bylo postupováno podle pokynů výrobce uvedených v kitu HotStar HiFidelity Polymerase Kit.

7.4.2.3 Složení reakčních směsí

Tabulka 21: Příklad složení reakčních směsí PCR pro 50µl reakci

Typ polymerázy	DreamTaq	HotStar HiFidelity
voda	40.7 µl	37 µl
pufr	5 µl	10 µl
primery (100 pmol/µl)	2 x 1 µl	2 x 0.5 µl
deoxynukleotidy (dNTPs)	1 µl (0.2mM každého dNTP)	výrobce optimalizovaná koncentrace obsažena v pufru
polymeráza	0.3 µl	1 µl (2.5 u/µl)
templát (25 ng/µl)*	1 µl	1 µl

* Při provádění PCR z plazmidů z transformovaných bakterií byl jako templát použit malý stěr z kolonie *E. coli*.

7.4.2.4 Semikvantitativní PCR

Ze vzorků izolované cDNA byly provedeny PCR reakce s přesnými primery pro sorbitoldehydrogenázu (Sor3.1) a s primery pro aktin (Actin_F a Actin_R viz Tabulku 19, Pan et al. 2014). Produkty PCR byly elektroforeticky ve stejném množství rozděleny na agarózovém gelu a vyfotografovány. Za pomoci programu GeneTools (verze 4.03.05.0) byla

určena intenzita jednotlivých proužků. Průměrná hodnota exprese aktinu pro každou variantu média byla použita jako reference. Exprese sorbitoldehydrogenázy byla vyjádřena jako procenta exprese aktinu.

7.4.3 Agarózová elektroforéza

Elektroforéza byla prováděna v agarózovém gelu (1.2% agaróza, 0.01% GelRed) za použití 0.5 x TAE pufru a 50V nebo 75V napětí po dobu 40-60 minut. Vzorky byly smíchány v poměru 5:1 s nanášecí barvou Loading Buffer (Fermentas). Zobrazení a pořízení fotografií bylo prováděno v UV transiluminátoru G:box od Syngene za pomoci programu GeneSnap (verze 7.12).

7.4.4 Klonování a transformace

Produkt PCR byl vyříznut z elektroforetického gelu a extrahován pomocí Quiagen Gel Extraction Kit (Quiagen) podle protokolu výrobce. Následně byl ligován přes 3' A přesahy tvořenými polymerázou do plazmidu pDrive, podle ligačního protokolu Quiagen PCR Cloning Kitu (Quiagen). Po inaktivaci ligázy (10 min, 70 °C) byly plazmidy elektroporovány do bakterií *E. coli* (viz Transformace bakterií).

7.4.5 Izolace plazmidů

Kolonie byly zaočkovány do 3 ml tekutého LB média s kanamycinem (50 mg/l) ve zkumavkách a přes noc inkubovány (37 °C, 180 rpm). Z nich pak byly izolovány plazmidy pomocí Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) podle protokolu výrobce.

7.4.6 Sekvenování

Sekvenování plazmidové DNA či PCR produktů bylo prováděno servisní Laboratoří sekvenace DNA PřF UK Sangerovou metodou v mikrokapiláře za použití fluorescenčního značení dideoxynukleotidů.

7.4.7 Restrikční štěpení

Restrikční štěpení bylo provedeno pro kontrolu správnosti PCR produktu. Restrikční směs (Tabulka 22) byla inkubována 1 hodinu při teplotě 37 °C. Restrikční enzym byl posléze inaktivován zahřátím směsi na 65 °C po dobu 20 minut. Produkty štěpení byly rozděleny elektroforeticky a vyfotografovány.

Tabulka 22: Příklad reakční směsi pro restrikční štěpení

HindIII (Fermentas)	10 x Buffer R	DNA	destilovaná voda
1 µl	2 µl	< 1 µg	doplněna do 20 µl

7.5 Obrazová a statistická analýza

Pro počítání klíčivosti semen bylo ustanoveno osm kategorií (Tabulka 23). Z fotografií byly určeny četnosti jednotlivých kategorií v programu ImageJ (verze 1.50i) za pomoci Cell Counter pluginu. Z každé vyšetě Petriho misky bylo do kategorií rozřazeno minimálně 200 objektů. Klíčivost pak byla počítána jako podíl součtu četností všech živých i mrtvých vyklíčených semen a protokormů vůči součtu četností všech kategorií vyjma semen nezralých. Klíčivost byla vždy počítána se vztažením na vysetou Petriho misku. Velikosti byly měřeny rovněž z fotografií v programu ImageJ, fotografie byly nakalibrovány podle fotografie měřítka. Byla měřena velikost (nejdelší průměr) všech živých i mrtvých vyklíčených semen a protokormů. Počty změřených objektů v jednotlivých pokusech jsou uvedeny v tabulce 33-37 v příloze. Při statistickém vyhodnocení obsahu endogenních sacharidů a škrobu nebyly do analýzy zahrnuty varianty s počtem opakování vzorků menším než 3.

Tabulka 23: Kategorie pro určení klíčivosti semen

Kategorie	Zkratka	Popis
nezralé semeno	NS	semeno bez embrya nebo s malým, zjevně nedovyvinutým embryem
semeno – nevyklíčené	S	semeno s normálně vyvinutým embryem, bez známek bobtnání
semeno – nabobtnalé	B	bobtnající semeno se zvětšeným embryem
semeno – vyklíčené	V	klíčící semeno, kde již došlo k protržení osemení
protokorm	P	vyklíčené semeno s vytvořenými vlásky
mrtvé semeno – nabobtnalé	DB	odumřelé (ztmavlé) nabobtnalé semeno
mrtvé semeno – vyklíčené	DV	odumřelé (ztmavlé) vyklíčené semeno
mrtvý protokorm	DP	odumřelý (ztmavlý) protokorm

Statistické vyhodnocení klíčivosti a velikostí vyklíčených semen a protokormů bylo prováděno v programu R (verze 3.2.4) (R Development Core Team 2016). Při hodnocení statistických rozdílů v klíčivosti byl používán neparametrický Kruskalův-Wallisův test s následným porovnáním pomocí Wilcoxonova párového testu. Pro zjištění rozdílů velikostí vyklíčených semen a protokormů byla po případné transformaci dat (viz jednotlivé kapitoly experimentů) použita hierarchická ANOVA s párovým srovnáním pomocí Tukey-HSD testu. Hladina významnosti byla vždy 0.05.

7.6 Design jednotlivých experimentů

7.6.1 Efekt sacharidů a glutaminu

Semena *Dactylorhiza majalis* byla vyseta na varianty SMS média vždy s jednou přidanou složkou (Tabulka 24) a jednu variantu kontrolní bez jakékoli přidané látky. Varianta se sacharózou byla použita jako pozitivní kontrola, neboť je považována za osvědčeným dobrý zdroj energie pro klíčící orchideje (Knudson 1922; Waes & Debergh 1986; Arditti 1967; Stewart & Kane 2010). Kromě variant s cukernými alkoholy, manózy a glutaminu byla vyseta i varianta se sukralózou. Sukralóza je chlorovaný derivát sacharózy. Je velice stabilní, rostlinami zřejmě nemetabolizovaná (Soh et al. 2011). Médium se sukralózou proto bylo použito k otestování, zda orchideje sukralózu metabolizují a jestli ji dokáží přijímat. Výsevy byly prováděny v opakování minimálně po sedmi Petriho miskách na variantu média. Po čtyřech měsících kultivace byla určena klíčivost semen a velikosti vyklíčených semen a protokormů, dále byl analyzován obsah rozpustných sacharidů a škrobu a exprese sorbitoldehydrogenázy. Jako doplňkový experiment byla stejným způsobem vyseta i semena *Anacamptis morio*, ta však byla kultivována jen tři měsíce, vyhodnocena byla pouze klíčivost a velikosti vyklíčených semen a protokormů.

Tabulka 24: Množství sacharidů a glutaminu pro varianty SMS média

Složka	Molární koncentrace	Množství na 1/4 l
D(+)-arabitol	100mM	3.800 g
D-manitol	100mM	4.555 g
D-manóza	100mM	4.500 g
D-sorbitol	100mM	4.550 g
glycerol	100mM	2.300 g
L-glutamin	100mM	3.653 g
meso-erythritol	100mM	3.050 g
sacharóza	50mM	4.279 g
sukralóza	50mM	4.970 g
xylitol	100mM	3.800 g

7.6.2 Efekt glutaminu a sacharózy

Semena *D. majalis* byla vyseta na varianty SMS média s různou koncentrací glutaminu nebo sacharózy nebo na kombinaci 29.21mM sacharózy s různými koncentracemi glutaminu (Tabulka 25) a jednu variantu kontrolní bez přidání jakékoli složky. Sacharóza byla opět použita pro srovnání, jako sacharid pro orchideje dobře užitelný (viz předchozí kapitolu). Od každé varianty bylo vyseto minimálně osm opakování. Po čtyřech měsících kultivace byla spočtena klíčivost, velikost protokormů a vyklíčených semen, rovněž byl zjištěn obsah rozpustných sacharidů.

Tabulka 25: Množství sacharózy a glutaminu ve variantách SMS média

Složka		Molární koncentrace	Množství na 1 l
L-glutamin		0.684 mM	0.1 g
		6.843 mM	1 g
		68.427 mM	10 g
		684.275 mM	30 g
sacharóza		0.292 mM	0.1 g
		2.921 mM	1 g
		29.214 mM	10 g
		87.643 mM	30 g
sacharóza (29.21mM ~ 10 g/l)	L-glutamin	0.684 mM	0.1 g
		6.843 mM	1 g
		68.427 mM	10 g
		684.275 mM	30 g

7.6.3 Efekt manitolu a sacharózy

Semena *D. majalis* byla vyseta na varianty SMS média s různými koncentracemi manitolu nebo odpovídajícími koncentracemi sacharózy (Tabulka 26). Jako negativní kontrola byly vyseta semena na variantu SMS média bez přídavku sacharidu. Disacharid sacharóza byl použit v poloviční molární koncentraci oproti monosacharidu manitolu, aby odpovídal počet cukerných jednotek. Média se sacharózou zde sloužila jako srovnání s dobře utilizovatelným sacharidem (viz kapitolu 7.6.2). V samostatném experimentu byla semena vyseta i na SMS média s dvěma různými koncentracemi sacharózy (5mM a 50 mM) s variantami koncentrací manitolu (Tabulka 27). Zde jako negativní kontroly posloužily varianty SMS média pouze se sacharózou v obou koncentracích. Po čtyřech měsících kultivace byly oba experimenty sklizeny, byla vyhodnocena klíčivost a velikosti protokormů a vyklíčených semen. Rovněž byl zjištěn obsah rozpustných sacharidů.

Tabulka 26: Množství manitolu a sacharózy ve variantách SMS média

Složka		Molární koncentrace	Množství na 1/5 l
manitol		1 mM	0.036 g
		10 mM	0.364 g
		50 mM	1.822 g
		100 mM	3.643 g
		300 mM	10.93 g
sacharóza		0.5 mM	0.034 g
		5 mM	0.342 g
		25 mM	1.712 g
		50 mM	3.424 g
		150 mM	10.272 g

Tabulka 27: Množství manitolu ve variantách SMS média se sacharózou

Složka		Molární koncentrace	Množství na 1/5 l
sacharóza (5 mM ~ 1.71 g/l)	manitol	1 mM	0.036 g
		10 mM	0.364 g
		50 mM	1.822 g
		100 mM	3.643 g
sacharóza (50 mM ~ 17.12 g/l)	manitol	1 mM	0.036 g
		10 mM	0.364 g
		50 mM	1.822 g
		100 mM	3.643 g

7.6.4 Symbiotický výsev *D. majalis*

Symbioticky byly vysety dvě varianty – s houbou rodu *Tulasnella* (TUL6N, poskytnuta Janou Jersákovou, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, izolována z *Dactylorhiza majalis*, sekvence ITS blízka k izolátu OTU6 (GenBank accession KC243937) z práce Těšitelová et al. 2013) a s houbou rodu *Ceratobasidium* (izolát široce používaný k symbiotickým výsevům orchidejí označovaný A36, zdroj Hardy Orchid Society, Velká Británie). Od každé varianty bylo vyseto 7 misek na médium OMA3 (viz kapitolu 7.1.2), které obsahuje pouze sacharidy, které by měly být pro samotné protokormy neutilizovatelné, houby by je naopak měly umět zpracovávat. Tři misky tohoto média s vyšetými semeny ale bez přidané houby byly použity jako negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola byl proveden výsev na osm misek s médiem 1/4- 2. Po dvou měsících kultivace ve tmě při 20 °C byl experiment sklizen, byla analyzována velikost protokormů, klíčivost, míra exprese sorbitoldehydrogenázy a obsah rozpustných cukrů.

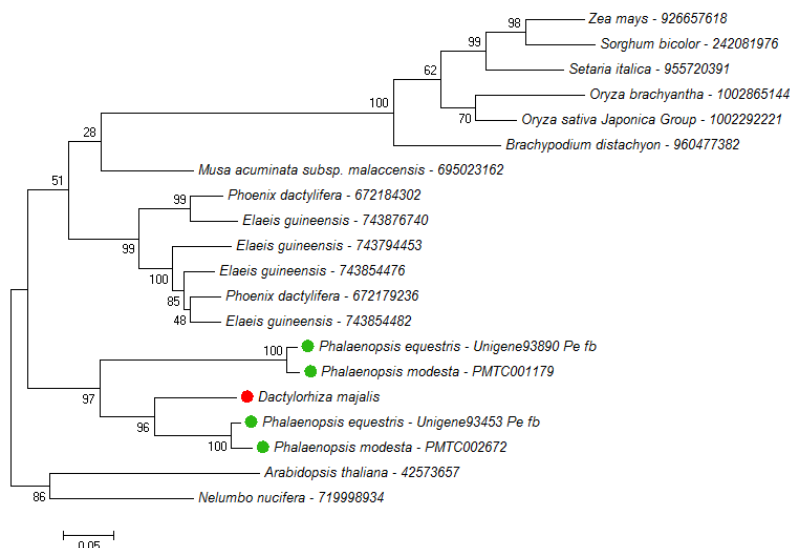
8 Výsledky

8.1 Sekvence manitoldehydrogenázy a sorbitoldehydrogenázy

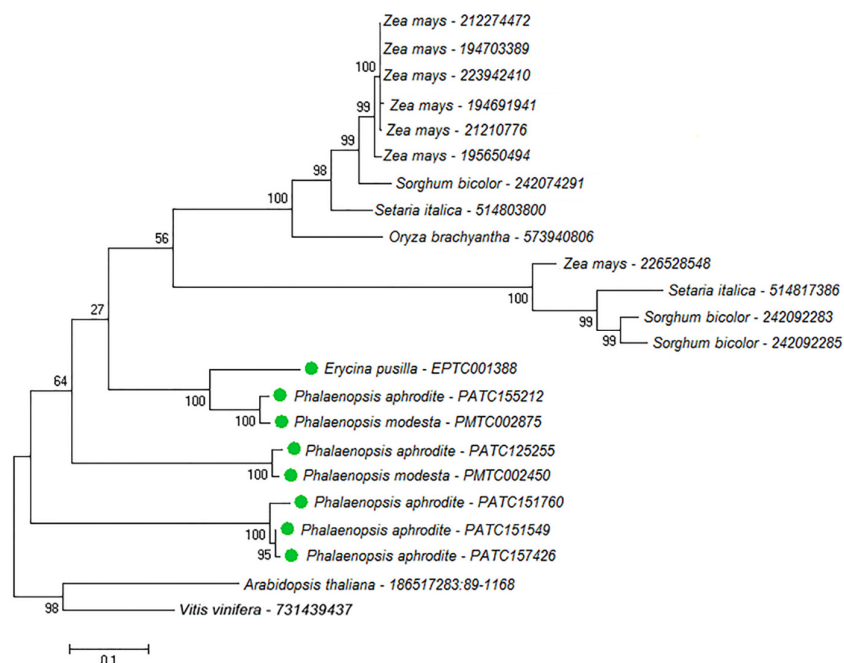
V dostatečné kvalitě se mi podařilo získat sekvenci sorbitoldehydrogenázy v délce 555 bp (Tabulka 28). Sekvence manitoldehydrogenázy se mi získat nepodařilo. Vyhledáním v databázích jsem získala 17 sekvencí potenciálních sorbitoldehydrogenáz jednoděložných rostlin, z toho čtyři z orchidejí. Celkový alignment sekvencí sorbitoldehydrogenáz sestával z 20 sekvencí v délce 2130 bp, z čehož 1316 pozic bylo variabilních a 1022 pozic bylo parsimonně informativních. Z fylogenetického stromu sorbitoldehydrogenáz (Obrázek 1) je vidět, že gen sorbitoldehydrogenázy prošel u orchidejí duplikací, která je pro ně zřejmě specifická (bootstrapová podpora 97 %). K další nezávislé duplikaci došlo u palem (bootstrapová podpora 99 %). V případě *Elaeis guineensis* patrně došlo ještě k dalším duplikacím. Sekvence získaná z *D. majalis* spadá do jedné z dvou větví sekvencí z ostatních orchidejí (bootstrapová podpora 96 %), z čehož lze předpokládat, že k duplikaci došlo u orchidejí dříve, než k oddělení rodů *Dactylorhiza* a *Phalaenopsis*.

Tabulka 28: Získaná část sekvence sorbitoldehydrogenázy z *D. majalis*.

```
ACACGAGTGTGCTGGTGTATTGAAGAGGTGGGAAGTGAAGTGAAGACACTGTGCTGGGCGACCGTGTGGCTCTAGAACCCGGAATCAGTTGTGGCCGCTGCAAG
TTTTGCAAGGGCGCCGCTACAACCTGTGTGTTGACATGAAATCTTCGCCACCCACCCGCTCCATGGGTCTCTTGCTAATAAGGTGGTGATCCTGCTGATCTGTGC
TTTAAGCTTCTGACAATCTGAGCCTGGAAGAGGGAGCCATGTGTGAGCCCTTAGTGTGGGGTGCATGCCTGTAGGAGAGCTAATATTGGCCAGAGACTAATGT
GCTCATAATGGGGGTGGGCTATAGGATTAGTCACGATGCTTGCCGCCGCTGCCTATGGTGCCCGGAGAATCATTATAGTAGATGTTGATGAATACCGCCTTTCAGT
TGCAAAATCTCTTGGCGCAGATGATTTGTAAAGTTCCACAAATATTCAGGATTGGATGAGGAAGTCCGGCAAATACAGACAGCTATGGGATCTGACATTGACA
TAACATTCGATTGCGCCG
```



Obrázek 1: Fylogenetický strom sorbitoldehydrogenáz z vybraných jednoděložných a dvouděložných rostlin sestrojený metodou maximální věrohodnosti (angl. maximum likelihood) za použití 1000 bootstrapových opakování, strom je zakořeněn na dvouděložných rostlinách (*A. thaliana* a *N. nucifera*), zeleně jsou označeny geny z orchidejí, červeně nově získaná sekvence z *D. majalis*, u všech sekvencí je uvedeno gi identifikační číslo z databáze NCBI (GenBank), u genů orchidejí je uvedeno identifikační číslo z databáze OrchidBase (*P. equestris*) a Orchidstra (*P. modesta*).



Obrázek 2: Fylogenetický strom manitoldehydrogenáz z vybraných jednoděložných a dvouděložných rostlin sestrojený metodou maximální věrohodnosti (angl. maximum likelihood) za použití 1000 bootstrapových opakování, strom je zakořeněn na dvouděložných rostlinách (*A. thaliana* a *V. vinifera*), zeleně jsou označeny geny z orchidejí, u všech sekvencí je uvedeno gi identifikační číslo z databáze NCBI, u genů orchidejí je uvedeno identifikační číslo z databáze Orchidstra.

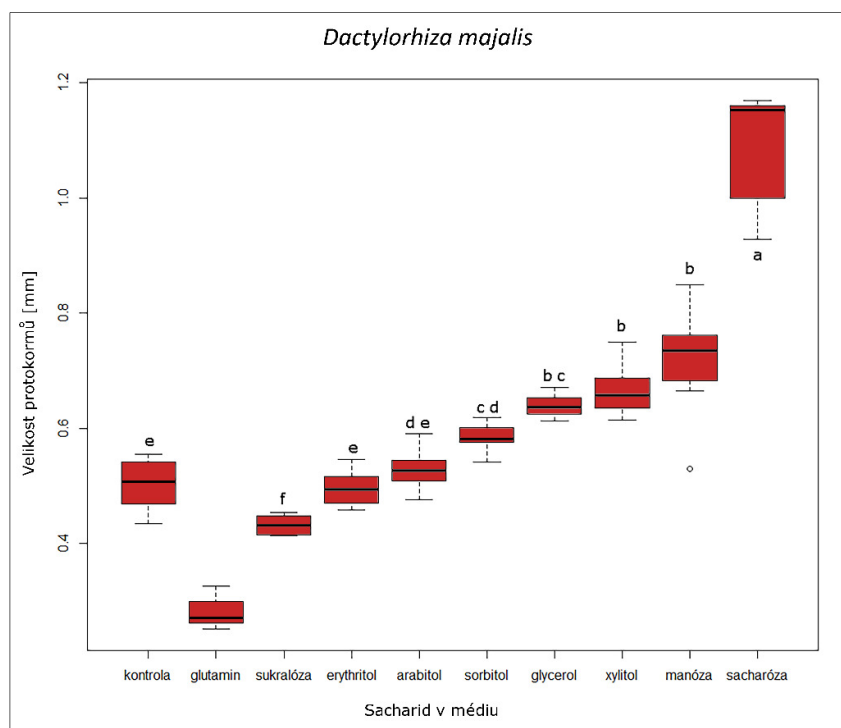
Celkový alignment sekvencí manitoldehydrogenáz sestával z 23 sekvencí v délce 1949 bp, z čehož 1410 pozic bylo variabilních a 1106 pozic bylo parsimonně informativních. Z fylogenetického stromu manitoldehydrogenáz (Obrázek 2) vyplývá, že orchidejové geny manitoldehydrogenázy tvoří tři skupiny, jak je vidět u *P. aphrodite* a *P. modesta*. Z *E. pusilla* je pouze jediná sekvence, což ale může být způsobeno nekompletním osekvenováním tohoto druhu. U trav se geny manitoldehydrogenázy dělí do skupin dvou, což lze pozorovat u *Z. mays*, *S. italica* a *S. bicolor*. V jakém vztahu jsou jednotlivé skupiny manitoldehydrogenázových genů však ze stromu určit nelze (Obrázek 2).

8.2 Efekt sacharidů a glutaminu

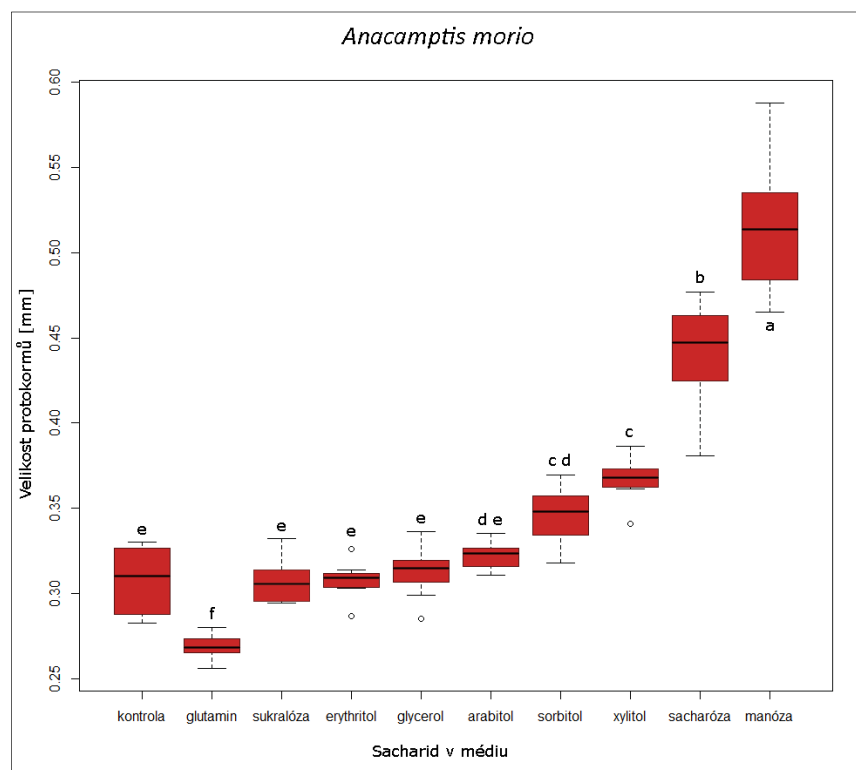
8.2.1 Růst protokormů

Bylo hodnoceno 7-9 misek na variantu, počet změřených objektů je uveden v Tabulce 1 v Přílohách. U obou zkoumaných druhů byl pozorovatelný podobný efekt jednotlivých sacharidů na růst protokormů (Graf 1 a Graf 2). Nejlépe rostly protokormy na médiích se sacharózou a manózou. U *A. morio* byly protokormy větší na médiu s manózou, u *D. majalis* byly větší na médiu se sacharózou. Pozitivní efekt na růst měl rovněž xylitol a sorbitol, u *D. majalis* pak i glycerol. Ostatní testované sacharidy růst nepodporovaly. Od kontroly se nelišily protokormy rostoucí na médiích s arabitolem a erythritolem, u *A. morio* též s glycerolem.

Neutrální (u *A. morio*) až negativní (u *D. majalis*) efekt měla sukralóza. Protokormy rostoucí na médiu s glutaminem byly u obou druhů menší než na kontrolním médiu a zároveň nejmenší ze všech variant.



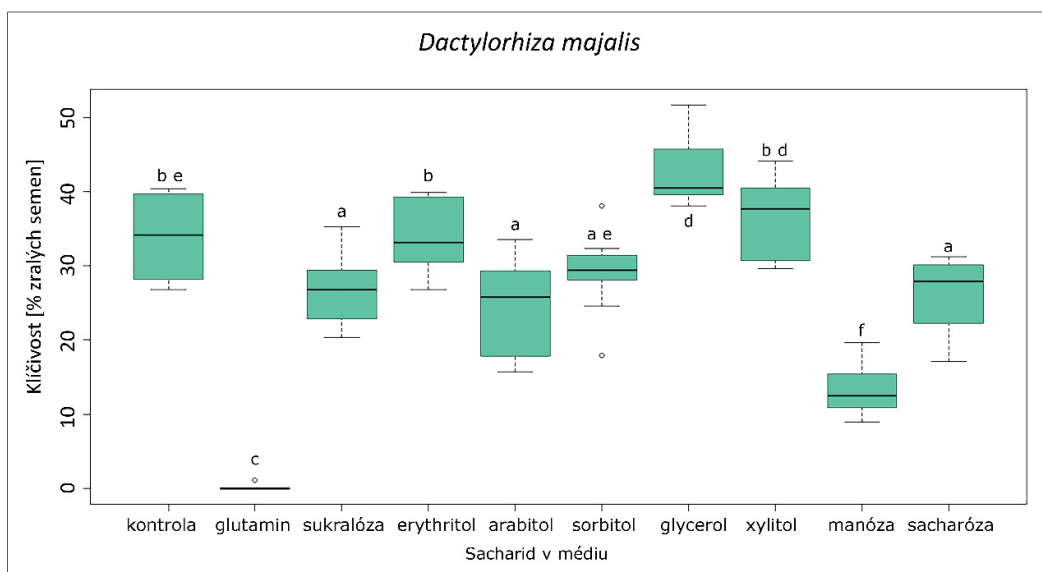
Graf 1: Velikost protokormů *D. majalis* na médiích s přidavkem různých sacharidů a glutaminu (koncentrace monosacharidů 100mM, koncentrace disacharidů 50mM, koncentrace glutaminu 100mM), rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi variantami zjištěný hierarchickou ANOVA a Tukey HSD testem po logaritmické transformaci dat, $p < 2e-16$, varianta s glutaminem byla pro malý počet narostlých protokormů vyloučena ze statistické analýzy.



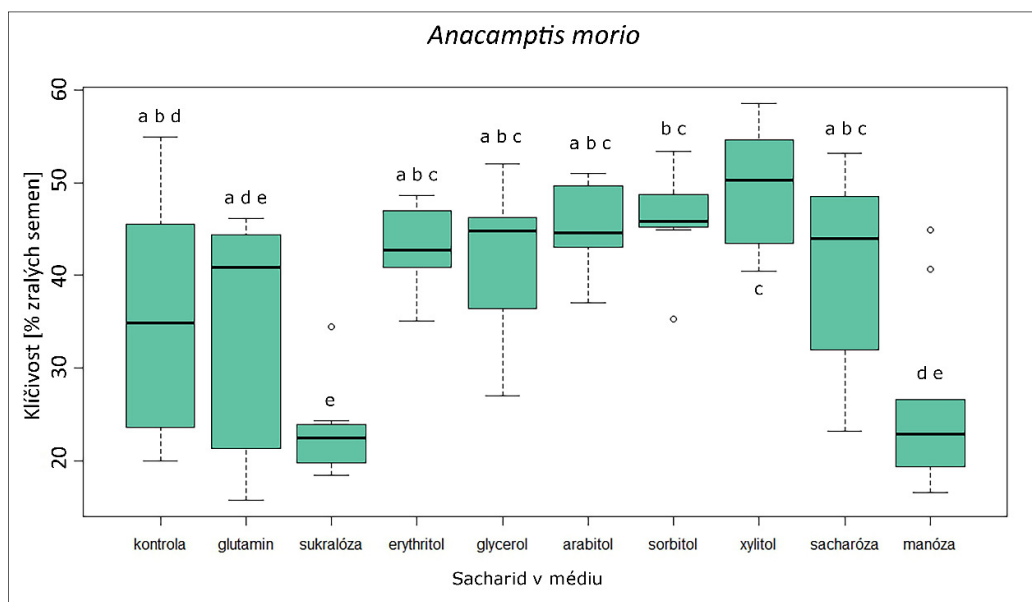
Graf 2: Velikost protokormů *A. morio* rostoucích na médiích s přidavkem různých sacharidů a glutaminu (koncentrace monosacharidů 100mM, koncentrace disacharidů 50mM, koncentrace glutaminu 100mM), rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi variantami zjištěný hierarchickou ANOVA a Tukey HSD testem po logaritmické transformaci dat, $p < 2e-16$.

8.2.2 Klíčivost

Klíčivost (Graf 3 a Graf 4), která byla zjišťována jako pomocný ukazatel, byla výrazně snížena oproti kontrole u obou druhů na médiu s manózou, u *A. morio* však statisticky neprůkazně. Glutamin výrazně snižoval klíčivost *D. majalis*, ale ne *A. morio*. Naproti tomu sukralóza výrazně snižovala klíčivost *A. morio*, ale jen velmi mírně u *D. majalis*. K průkaznému zvýšení klíčivosti oproti kontrole došlo pouze u varianty s glycerolem u *D. majalis*.



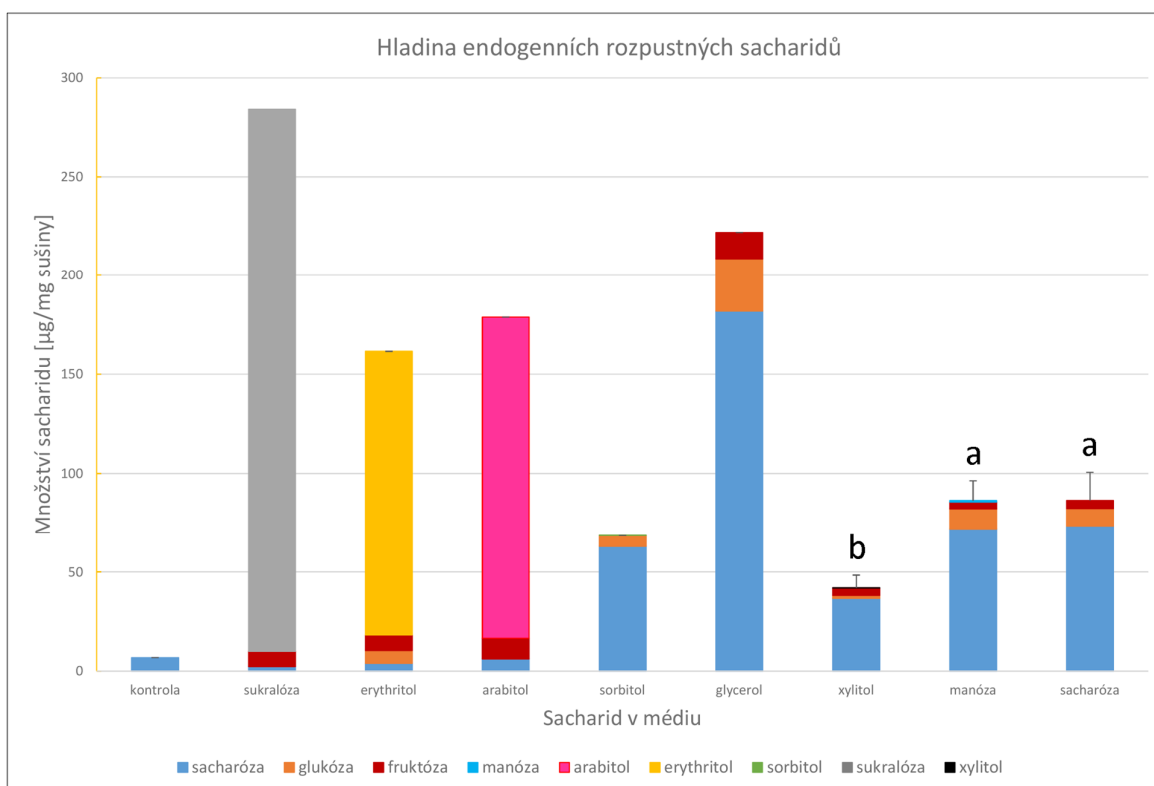
Graf 3: Klíčivost (vyjádřená procentem vyklíčených semen ze všech zralých semen) semen *D. majalis* na médiích s přidavkem různých sacharidů a glutaminu (koncentrace monosacharidů 100mM, koncentrace disacharidů 50mM, koncentrace glutaminu 100mM), rozdílná písmena značí signifikantní rozdíly mezi variantami zjištěné Kruskalovým-Wallisovým testem a párovým Wilcoxonovým testem, $p = 1.711 \times 10^{-10}$.



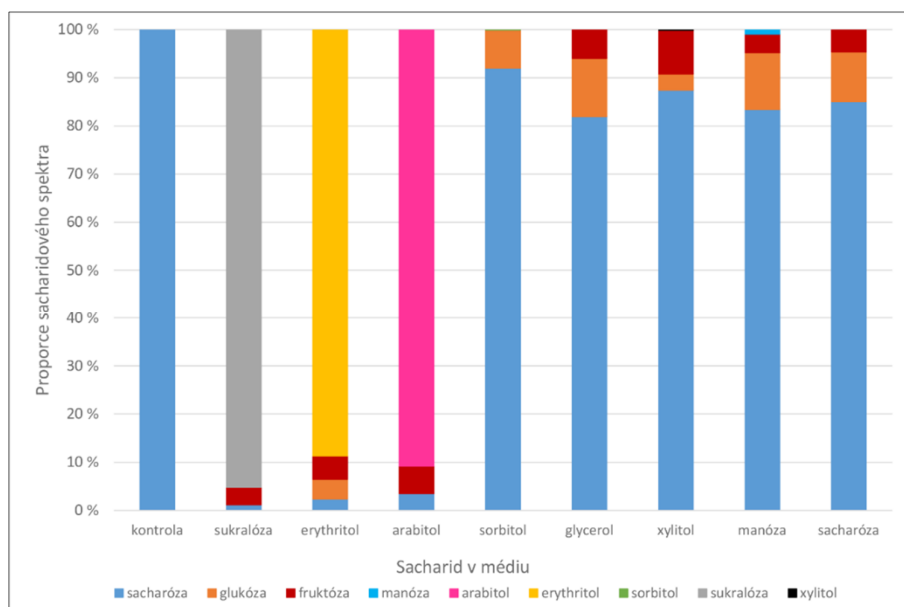
Graf 4: Klíčivost semen (vyjádřená procentem vyklíčených semen ze všech zralých semen) *A. morio* na médiích s přidavkem různých sacharidů a glutaminu (koncentrace monosacharidů 100mM, koncentrace disacharidů 50mM, koncentrace glutaminu 100mM), rozdílná písmena značí signifikantní rozdíly mezi variantami zjištěné Kruskalovým-Wallisovým testem a párovým Wilcoxonovým testem, $p = 6.622 \times 10^{-5}$.

8.2.3 Obsah endogenních rozpustných sacharidů

Hladina endogenních rozpustných sacharidů v protokormech (Graf 5, Graf 6, Tabulka 29) *D. majalis* byla ve všech variantách vyšší než u kontroly. Protokormy rostoucí na médiu bez přidaného sacharidu obsahovaly pouze malé množství sacharózy. Protokormy rostoucí na sorbitolu, glycerolu, xylitolu, manóze a sacharóze obsahovaly velké množství sacharózy, menší množství glukózy a fruktózy a případně minoritní množství dalších sacharidů. Nejvyšší obsahy těchto sacharidů vykazovaly protokormy pěstované na glycerolu, nejnižší naopak na xylitolu. Protokormy pěstované na arabitolu a erythritolu obsahovaly velká množství těchto cukerných alkoholů a jen malé množství sacharózy, fruktózy a v případě erythritolu i glukózy. V protokormech pěstovaných na sukralóze byla akumulována sukralóza, protokormy obsahovaly i malé množství sacharózy a fruktózy.



Graf 5: Hladina endogenních rozpustných sacharidů v protokormech *D. majalis* pěstovaných na médiích s přidavkem různých sacharidů a glutaminu (koncentrace monosacharidů 100mM, koncentrace disacharidů 50mM, koncentrace glutaminu 100mM), chybové úsečky značí směrodatné odchylky celkové hladiny rozpustných sacharidů, nejsou u variant s počtem opakování menším než 3, odlišná písmena značí signifikantní rozdíl zjištěný pomocí ANOVA a Tukey HSD testu, varianty s počtem opakování menším než 3 nebyly do statistické analýzy zahrnuty, $p = 0.00418$, jednotlivé hodnoty viz Tabulka 29.



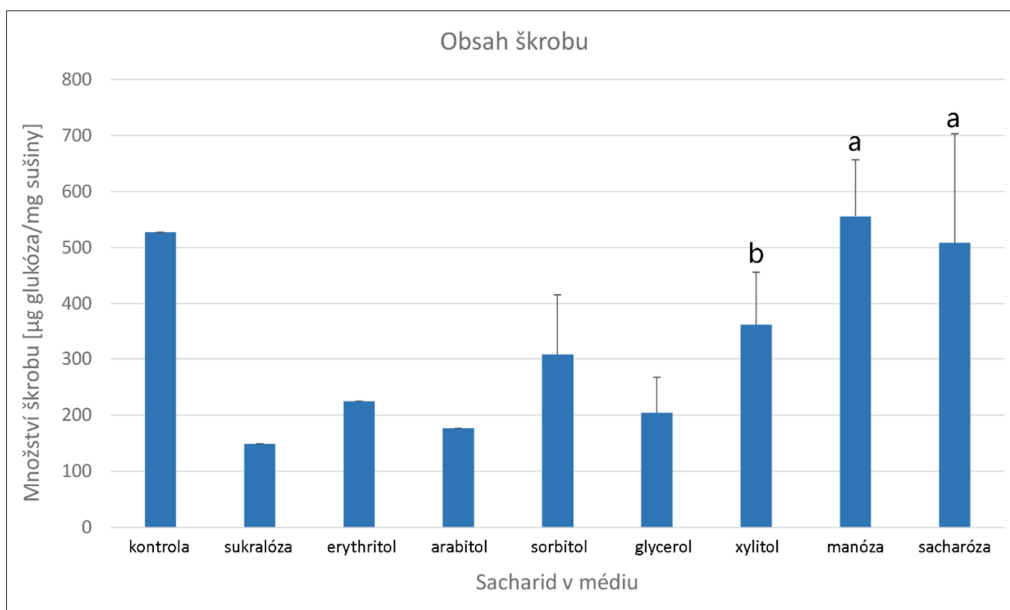
Graf 6: Procentuální zastoupení jednotlivých sacharidů v sušině protokormů *D. majalis* pěstovaných na médiích s přidavkem různých sacharidů a glutaminu (koncentrace monosacharidů 100mM, koncentrace disacharidů 50mM, koncentrace glutaminu 100mM).

Tabulka 29: Průměrné obsahy endogenních rozpustných sacharidů v protokormech *D. majalis* pěstovaných na médiích s přidavkem různých sacharidů a glutaminu (koncentrace monosacharidů 100mM, koncentrace disacharidů 50mM, koncentrace glutaminu 100mM) a jejich směrodatné odchylky, rozdílná písmena v horním indexu značí statisticky signifikantní rozdíly zjištěné ANOVA a párovým porovnáním Tukeyho HSD testem, varianty s počtem opakování menším než 3 nebyly do analýzy zahrnuty.

	Obsah endogenních rozpustných sacharidů [μg / mg sušiny]									
Sacharid v médiu	arabitol	erithrytol	fruktóza	glukóza	manóza	sacharóza	sorbitol	sukralóza	xylitol	celkové cukry
bez cukru	0	0	0	0	0	6.757	0	0	0	6.757
arabitol	162.24	0	10.35	0	0	6.167	0	0	0	178.76
erythritol	0	143.279	7.778	6.58	0	3.87	0	0	0	161.507
glycerol	0	0	13.216 ± 5.894	26.806 ± 3.437	0	181.792 ± 29.759	0	0	0	221.814 ± 38.471
manóza	0	0	3.347 ± 0.468 a	10.197 ± 1.415 a	0.784 ± 0.23	72.051 ± 7.9 a	0	0	0	86.38 ± 9.999 a
sacharóza	0	0	4.034 ± 0.854 a	8.851 ± 2.438 a	0	73.512 ± 1.943 a	0	0	0	86.397 ± 14.234 a
sukralóza	0	0	7.59	0	0	2.36	0	274.15	0	284.1
sorbitol	0	0	0	5.455 ± 3.797	0	62.962 ± 1.475	0.047 ± 0.651	0	0	68.464 ± 5.278
xylitol	0	0	3.794 ± 2.598 a	1.418 ± 0.924 b	0	36.723 ± 2.967 b	0	0	0.066 ± 0.129	42.002 ± 6.473 b
p-hodnota	-	-	0.318	0.00367	-	0.00776	-	-	-	0.00418

8.2.4 Obsah škrobu

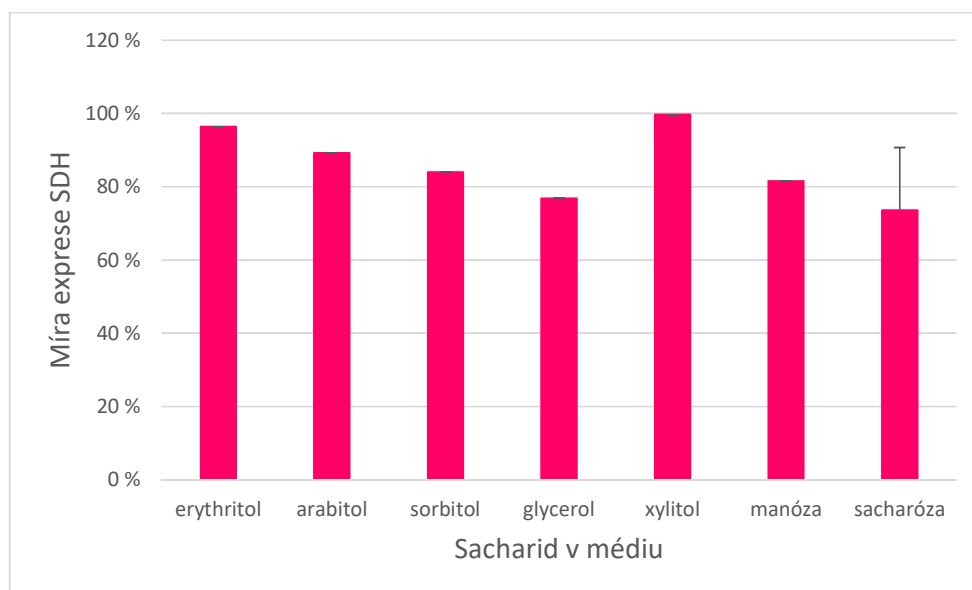
Nejvíce škrobu obsahovaly varianty rostoucí na médiu s manózou, sacharózou a bez přidaného sacharidu (Graf 7). O něco méně ho bylo ve variantách na xylitolu a sorbitolu. Nejméně škrobu obsahovaly varianty rostoucí na sukralóze, erythritolu, arabitolu a glycerolu.



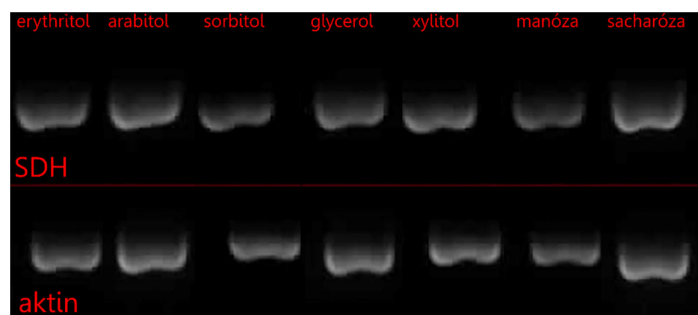
Graf 7: Průměrné hodnoty množství škrobu v protokormech *D. majalis* pěstovaných na médiích s přidavkem různých sacharidů a glutaminu (koncentrace monosacharidů 100mM, koncentrace disacharidů 50mM, koncentrace glutaminu 100mM), chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku, rozdílná písmena znamenají statisticky významný rozdíl zjištěný pomocí ANOVA a párovým porovnáním v Tukeyho HSD testu, $p = 0.00704$.

8.2.5 Míra exprese SDH

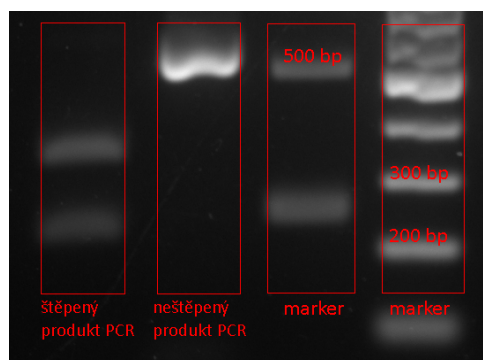
Míra exprese SDH se mezi variantami médií výrazně nelišila (Graf 8 a Obrázek 3 a 4). Lze pozorovat mírně vyšší expresi na médiu s xylitolem, menší pak na médiu s glycerolem. Bohužel v experimentu nenarostl dostatek rostlinného materiálu na tvorbu dostatečného počtu opakování pro statistickou analýzu, signifikanci těchto rozdílů tak není možné určit.



Graf 8: Míra exprese sorbitoldehydrogenázy v protokormech *D. majalis* pěstovaných na médiích s přidavkem různých sacharidů a glutaminu (koncentrace monosacharidů 100mM, koncentrace disacharidů 50mM, koncentrace glutaminu 100mM), míra exprese je vyjádřena jako procenta z míry exprese aktinu, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.



Obrázek 3: Míra exprese sorbitoldehydrogenázy (SDH) v protokormech *D. majalis* v porovnání s expresí aktinu zjištěná pomocí semikvantitativní PCR, nad sebou jsou vždy vzorky ze stejné varianty média.

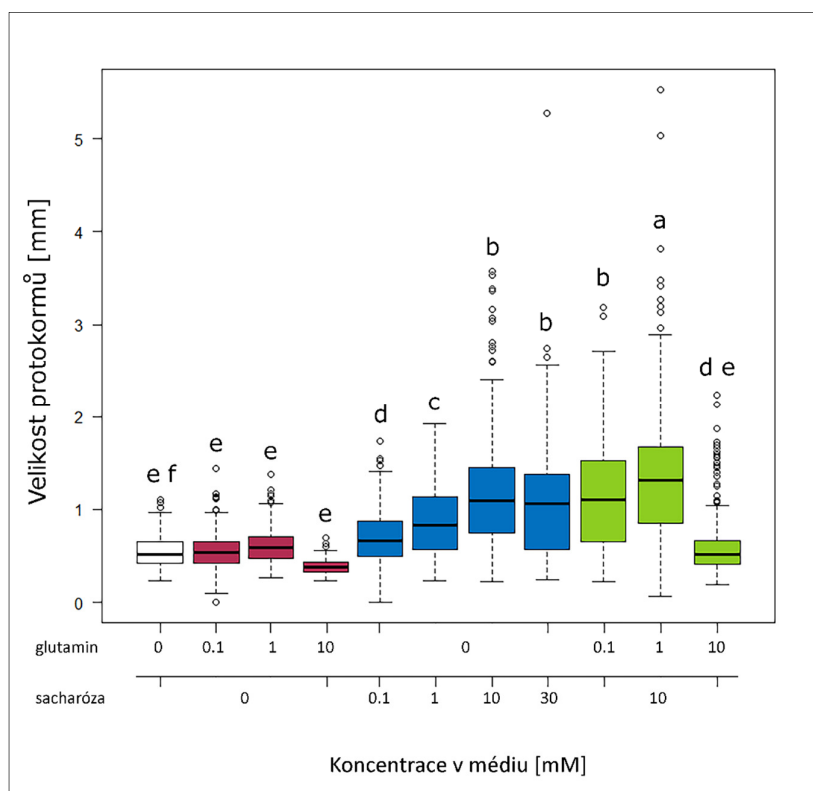


Obrázek 4: Kontrolní štěpení produktu semikvantitativní PCR cílící na SDH z *D. majalis* restrikční endonukleázou HindIII: proběhlo předpokládané rozštěpení produktu PCR o přibližně 500 bp na dvě části o 200 a 300 bp.

8.3 Efekt glutaminu a sacharózy

8.3.1 Růst protokormů

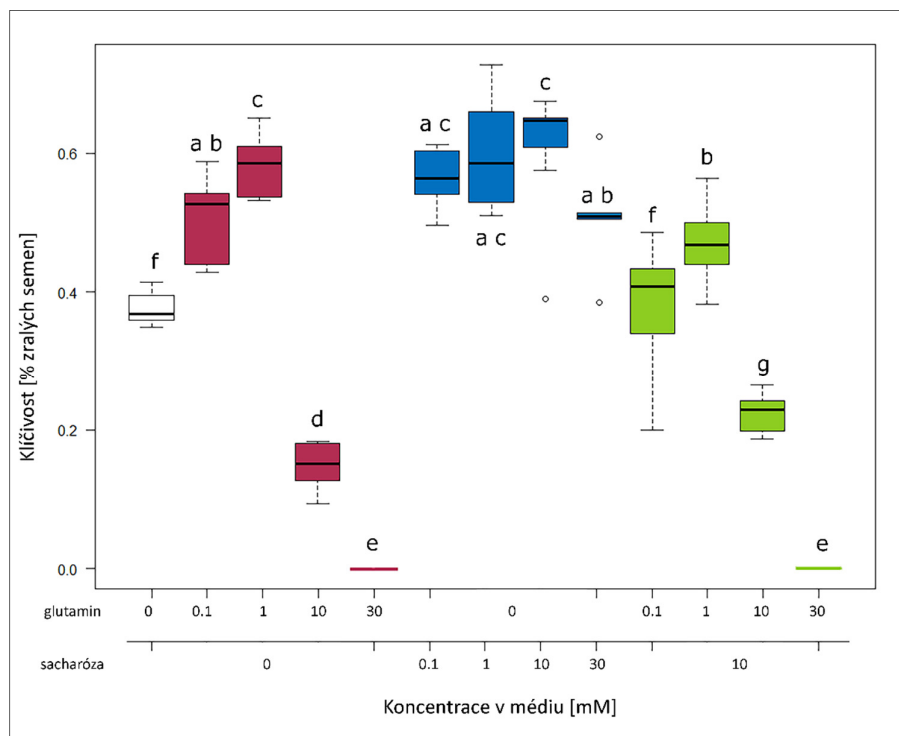
Bylo hodnoceno 6-8 misek na variantu. Varianty obsahující pouze glutamin se nelišily od kontroly. Pouze při koncentraci glutaminu 10 mM byly protokormy menší než v kontrolní variantě, ale rozdíl nebyl statisticky průkazný (Graf 9). Signifikantně větší růst vykazovaly protokormy rostoucí na sacharóze. Růst nejlépe podporovaly koncentrace sacharózy 10 mM a 30 mM. Protokormy na kombinaci 10 mM sacharózy s 0,1 mM glutaminu byly stejně velké jako na samotné sacharóze. Pokud bylo ke stejné koncentraci sacharózy přidáno 1mM glutaminu, protokormy vyrostly signifikantně větší než na samotné sacharóze. Přídavek 10 mM glutaminu již ale vykazoval silně inhibiční afekt na růst protokormů (Graf 9). Na nejvyšších koncentracích glutaminu (30mM), ať se sacharózou či bez, nevyrostly žádné protokormy.



Graf 9: Velikost protokormů *D. majalis* na médiích s různým obsahem glutaminu a sacharózy, rozdílná písmena znamenají signifikantní rozdíl mezi variantami zjištěný hierarchickou ANOVA a Tukey HSD testem po logaritmické transformaci dat, $p < 2e-16$.

8.3.2 Klíčivost

Přídavek samotného glutaminu v koncentracích 0,1 a 1 mM zvyšoval klíčivost oproti kontrole (Graf 10). Koncentrace 10 mM už ale byla silně inhibiční a na 30 mM glutaminu nevyklíčila žádná semena, a to ani v přítomnosti sacharózy. Na médiích se samotnou sacharózou byla klíčivost vždy vyšší než u kontroly, nejvyšší při koncentraci sacharózy 10 mM. Přídavek glutaminu k 10mM sacharóze vždy snižoval klíčivost, nejméně výrazně při koncentraci glutaminu 1mM (Graf 10).

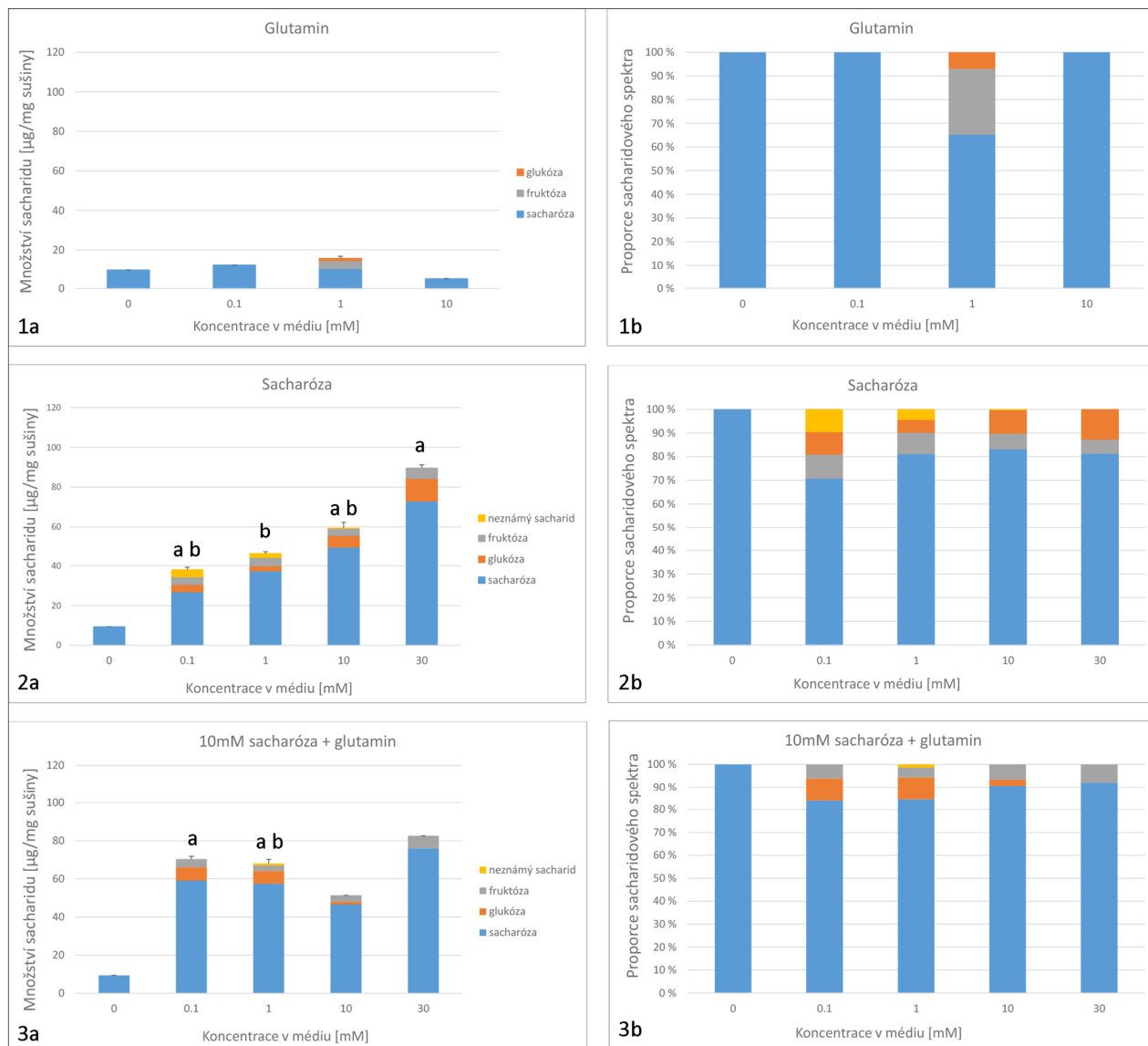


Graf 10: Klíčivost semen *D. majalis* (vyjádřená procentem vyklíčených semen ze všech zralých semen) na médiích s různým obsahem glutaminu a sacharózy, rozdílná písmena znamenají signifikantní rozdíl mezi variantami zjištěný pomocí Kruskalova-Wallisova testu a Wilcoxonova párového testu, $p = 2.009e-12$.

8.3.3 Obsah endogenních rozpustných sacharidů

Při analýze endogenních sacharidů (Graf 11 a Tabulka 30) nebylo možné udělat dost vzorků pro provedení statistické analýzy od každé varianty média. Přesto byl pozorovatelný jistý rozdíl mezi variantami. Protokormy rostoucí pouze na glutaminu, obsahovaly pouze malé množství cukrů, srovnatelné s negativní kontrolou. Ve vzorku z varianty s nejvyšší koncentrací glutaminu (30mM) se nepodařilo naměřit žádný cukr. Na médiích se sacharózou, která byla použita jako pozitivní kontrola, stoupal obsah endogenních sacharidů společně se vzrůstající koncentrací sacharózy. Protokormy rostoucí na médiu obsahující 10mM sacharózu společně s

různou koncentrací glutaminu se v obsahu sacharidů v podstatě nelišily od média se samotnou 10mM sacharózou.



Graf 11: Obsah endogenních rozpustných sacharidů v protokormech *D. majalis* na médiích s různou koncentrací glutaminu (1a, 1b), různou koncentrací sacharózy (2a, 2b) a médií s 10mM sacharózou a různými koncentracemi glutaminu (3a, 3b), rozdílná písmena nad sloupci značí signifikantní rozdíly zjištěné Kruskalovým-Wallisovým testem a párovým Wilcoxonovým porovnáním, chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku, varianty s počtem opakování menší než 3 nebyly do statistické analýzy zahrnuty, $p = 0.03591$, jednotlivé hodnoty množství sacharidů viz Tabulka 30.

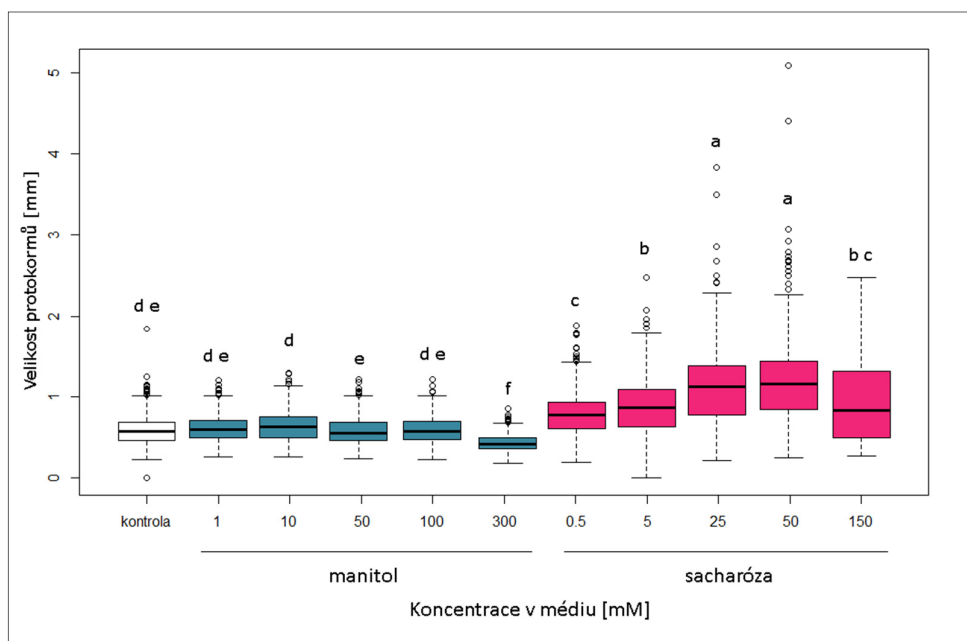
Tabulka 30: Průměrné hodnoty jednotlivých sacharidů v $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny protokormů *D. majalis* na médiích s různou koncentrací glutaminu a sacharózy a jejich směrodatné odchylky, rozdílná písmena v horním indexu značí signifikantní rozdíly v obsahu jednotlivých sacharidů ve variantách zjištěné Kruskalovým-Wallisovým testem a párovým Wilcoxonovým porovnáním.

		Obsah endogenních rozpustných sacharidů [$\mu\text{g} / \text{mg}$ sušiny]				
Sacharid v médiu [mM]		sacharóza	glukóza	fruktóza	neznámý sacharid	celkové cukry
glutamin	0	9.39 \pm 0	0	0	0	9.39 \pm 0
	0.1	12.316 \pm 0	0	0	0	12.316 \pm 0
	1	10.257 \pm 1.111	1.068 \pm 0	4.355 \pm 0	0	6.484 \pm 1.111
	10	5.017 \pm 0	0	0	0	5.017 \pm 0
	30	0	0	0	0	0
sacharóza	0.1	26.914 \pm 0.284 ^a	3.623 \pm 2.663	3.881 \pm 0	3.596 \pm 0	13.638 \pm 1.235 ^{a b}
	1	37.479 \pm 2.196 ^a	2.509 \pm 0.881 ^b	4.154 \pm 0.445	1.99 \pm 0.195	11.533 \pm 0.929 ^b
	10	49.39 \pm 6.914 ^a	5.843 \pm 1.414 ^b	3.975 \pm 0.476	0.143 \pm 0	18.229 \pm 2.935 ^{a b}
	30	72.953 \pm 3.49 ^b	11.357 \pm 0.84 ^a	5.318 \pm 0.344	0	29.876 \pm 1.558 ^a
10mM sacharóza + glutamin	0.1	59.072 \pm 2.555 ^a	7.052 \pm 1.419 ^b	4.26 \pm 0.542	0	23.461 \pm 1.505 ^a
	1	57.427 \pm 5.211 ^a	6.757 \pm 1.09 ^b	2.907 \pm 0.272	0.95 \pm 0	20.222 \pm 2.191 ^{a b}
	10	46.603 \pm 0	1.392 \pm 0	3.4 \pm 0	0	17.132 \pm 0
	30	76.044 \pm 0	0	6.57 \pm 0	0	41.307 \pm 0
p – hodnota		0.003404	0.000321	0.00581	-	0.03591

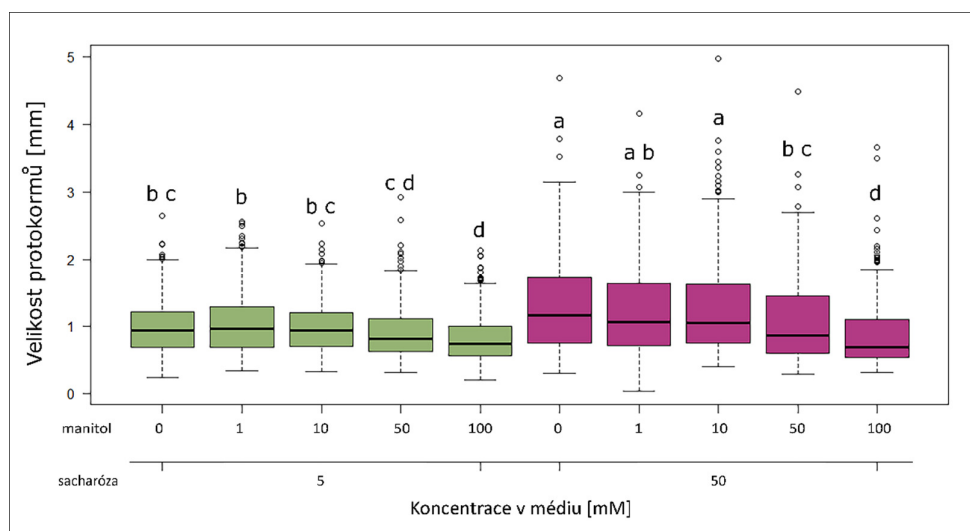
8.4 Efekt manitolu a sacharózy

8.4.1 Růst protokormů

Hodnoceno bylo 5-8 misek na variantu. Velikost protokormů rostoucích na různých koncentracích manitolu se nelišila od kontroly bez sacharidu až na variantu s nejvyšší koncentrací manitolu (300 mM), kde byly protokormy menší (Graf 12). Na variantách se samotnou sacharózou byly protokormy vždy větší než u kontroly. Největší byly při koncentraci sacharózy 25 mM a 50 mM (Graf 12). Přídavek manitolu k 5mM sacharóze ani k 50 mM sacharóze nezvyšoval růst (Graf 13). Při vyšších koncentracích manitolu (50 mM a 100 mM) se projevoval jeho inhibiční efekt na růst (Graf 13). V případě kombinace s 5 mM sacharózou byl inhibiční efekt manitolu slabší a průkazný až při jeho koncentraci 100 mM (Graf 13).



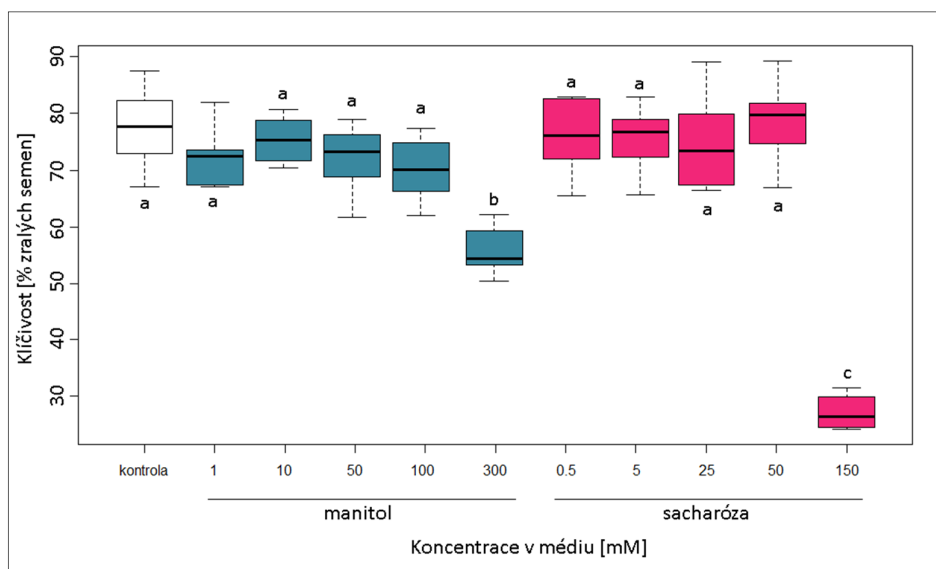
Graf 12: Velikost protokormů *D. majalis* na médiích s různým obsahem manitolu a sacharózy, odlišná písmena značí statisticky významné rozdíly zjištěné hierarchickou ANOVA a Tukey HSD testem po dekadicky logaritmické transformaci, $p < 2e-16$.



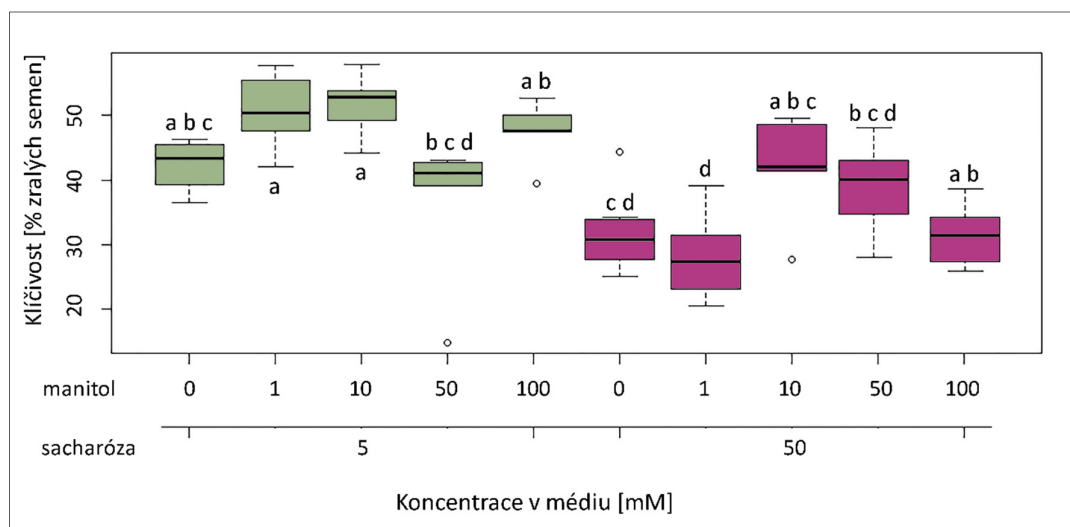
Graf 13: Velikost protokormů *D. majalis* na médiích s různou koncentrací sacharózy a manitolu, odlišná písmena značí statisticky významné rozdíly, zjištěné hierarchickou ANOVA a Tukey HSD testem po dekadicky logaritmické transformaci, $p = 1.542905e-15$.

8.4.2 Klíčivost

Na médiích se samotným manitolem či samotnou sacharózou byla klíčivost obdobná jako na kontrolním médiu bez přidaného sacharidu (Graf 14). Výjimkou byly nejvyšší použité koncentrace manitolu (300 mM) a sacharózy (150mM), které klíčivost výrazně snižovaly (Graf 14). V experimentu kombinujícím sacharózu s manitolem (Graf 15), byla klíčivost při nižší koncentraci sacharózy (5mM) vyšší na nízkých koncentracích manitolu (1 a 10mM), rozdíly však nebyly statisticky významné. Při vyšší koncentraci sacharózy (50mM) byla situace obdobná. Při srovnání variant s 5mM a 50mM sacharózou byla při stejných koncentracích manitolu vždy menší klíčivost na variantě s vyšší koncentrací sacharózy, tento rozdíl byl však statisticky významný pouze ve variantě s 1mM manitolem (Graf 15).



Graf 14: Klíčivost semen *D. majalis* (procentem vyklíčených semen ze všech zralých semen) na médiích s různým obsahem manitolu a sacharózy, odlišná písmena značí statisticky významný rozdíl zjištěný pomocí ANOVA a Tukeyho HSD testu, $p < 2.2 \times 10^{-16}$.

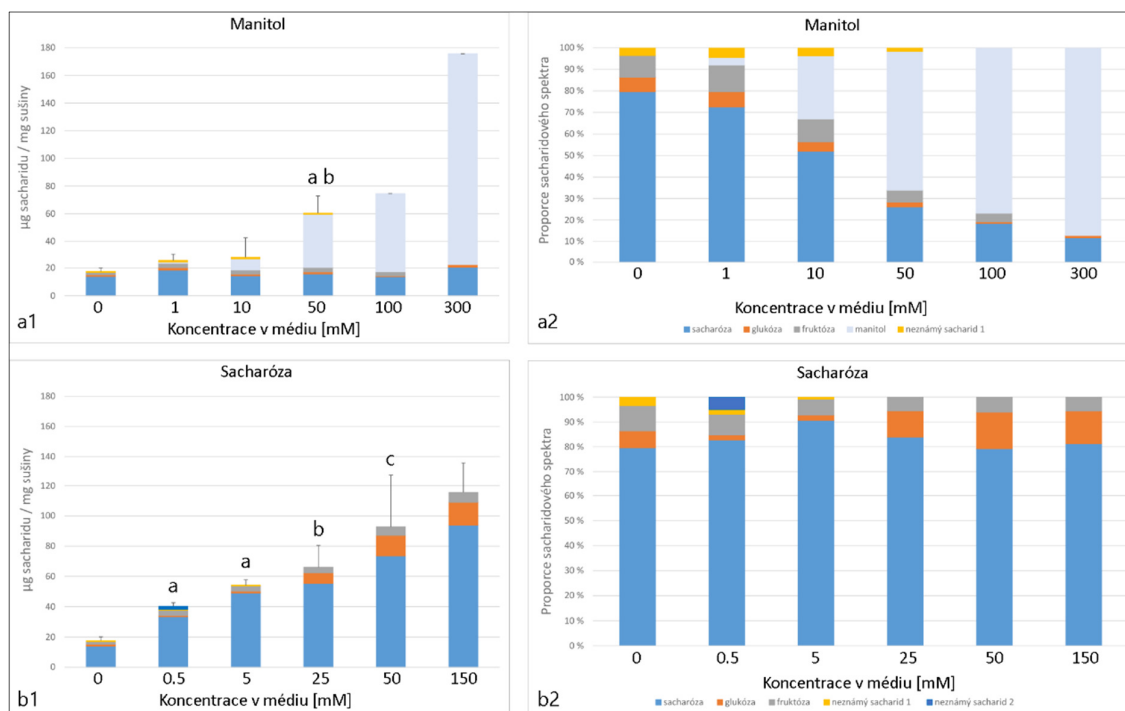


Graf 15: Klíčivost semen *D. majalis* (vyjádřená procentem vyklíčených semen ze všech zralých semen) na médiích s různou koncentrací sacharózy a manitolu, odlišná písmena značí statisticky významné rozdíly zjištěné pomocí ANOVA a Tukeyho HSD testu, $p < 2e-16$.

8.4.3 Obsah endogenních rozpustných sacharidů

Celkový obsah sacharidů (Graf 16 a Tabulka 31) v protokormech pěstovaných na médiu s manitolem se zvyšoval s rostoucí koncentrací manitolu. Tento nárůst byl však způsoben pouze zvyšováním obsahu manitolu ve spektru obsažených sacharidů, přičemž hladina ostatních sacharidů zůstávala stejná jako u kontroly bez manitolu. U variant rostoucích na sacharóze vedla zvyšující se koncentrace sacharózy k méně výraznému nárůstu celkového obsahu cukrů, proporce sacharidového spektra se neměnily a obsahy všech endogenních rozpustných sacharidů narůstaly stejnou měrou.

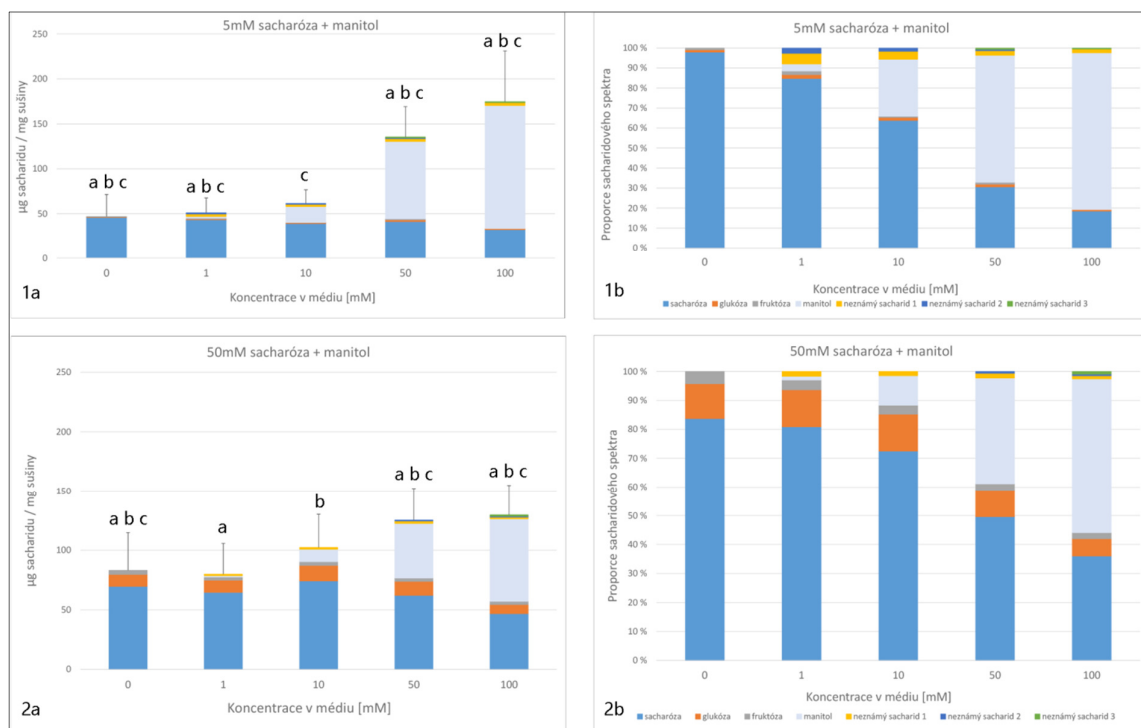
U variant rostoucí na kombinaci sacharózy a manitolu (Graf 17 a Tabulka 32) byl celkový obsah cukrů vyšší u variant s 50mM sacharózou než u variant s 5mM sacharózou. Reakce na přidání manitol však byla v obou situacích prakticky stejná. Se stoupající koncentrací manitolu v médiu stoupala i jeho koncentrace v protokormech. Zvyšoval se celkový obsah rozpustných sacharidů, ale obsah sacharózy i hexózy se spíše mírně snižoval a nárůst celkového obsahu rozpustných sacharidů byl způsoben pouze akumulací manitolu.



Graf 16: Obsah endogenních rozpustných sacharidů v protokormech *D. majalis* rostoucích na médiích s různou koncentrací manitolu (a1, a2) nebo sacharózy (b1, b2), rozdílná písmena nad sloupce značí rozdíly mezi hodnotami vyhodnocené Kruskalovým-Wallisovým testem a Wilcoxonovým testem při $\alpha = 0.05$, varianty s počtem opakování menším než 3 nebyly zahrnuty do analýzy, $p = 0.002158$, jednotlivé hodnoty průměrů viz Tabulka 31.

Tabulka 31: Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky obsahu sacharidů (v $\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny) protokormů *D. majalis* pěstovaných na médiích s různou koncentrací manitolu a sacharózy, odlišná písmena v horním indexu značí signifikantní rozdíl zjištěný pomocí Kruskalova-Wallisova testu a Wilcoxonova párového testu.

		Obsah endogenních rozpustných sacharidů [$\mu\text{g} / \text{mg}$ sušiny]						
Sacharid v médiu	koncentrace [mM]	sacharóza	glukóza	fruktóza	manitol	neznámý sacharid 1	neznámý sacharid 2	celkové cukry
manitol	0	4.76 \pm 0.08	0.215 \pm 0.32	0.317 \pm 0.89	0	0.111	0	1.528 \pm 0.43
	1	6.329 \pm 0.61	0.324 \pm 1.35	0.569 \pm 0.23	16.444 \pm 0.05	0.206	0	5.282 \pm 0.56
	10	4.934 \pm 3.87	0.22 \pm 0.87	0.532 \pm 0.73	147.942 \pm 1.91	0.192 \pm 0.06	0	30.764 \pm 1.49
	50	4.715 \pm 0.69 ^a	0.102	0.528 \pm 1.05 ^b	1044.084 \pm 2.38 ^a	0	0	262.357 \pm 1.37 ^{a b}
	100	7.054	0.343	0	2792.021	0	0	933.139
sacharóza	300	5.398	0.239	0.61	711.16	0.173	0	195.629
	0.5	11.406 \pm 0.4 ^a	0.152	0.6 \pm 0.36 ^b	0	0.14 \pm 0.02	0.364	3.681 \pm 0.29 ^{a b}
	5	32.122 \pm 0.66 ^{a b}	2.736 \pm 0.43	1.176 \pm 0.06 ^b	0	0	0	12.011 \pm 0.38 ^{a b}
	25	18.974 \pm 2.14 ^b	1.253 \pm 0.43	0.665 \pm 0.32 ^b	0	0	0	6.964 \pm 0.97 ^b
	50	16.812 \pm 5.29	0.21 \pm 1.1	0.625 \pm 0.58	0	0.081	0	5.302 \pm 2.32
p-hodnota	150	25.17 \pm 9.2	2.458 \pm 0.32	1.014 \pm 0.59	0	0	0	9.547 \pm 3.37
		0.002170	0.001703	0.011000	0.001324	-	-	0.002158



Graf 17: Obsah endogenních rozpustných sacharidů v protokormech *D. majalis* na médiích o různé koncentraci sacharózy a manitolu, rozdílná písmena značí statisticky významné rozdíly zjištěné Kruskalovým-Wallisovým testem a párovým Wilcoxonovým testem při $\alpha = 0.05$, hodnoty k jednotlivým sacharidům viz Tabulka 32.

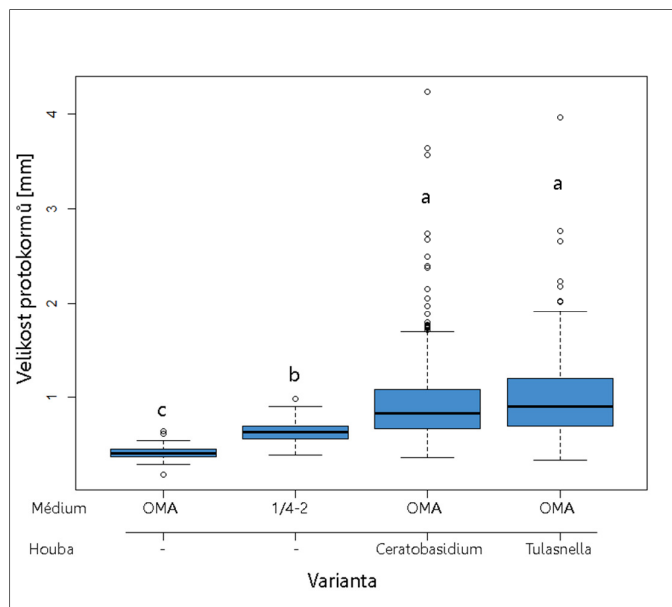
Tabulka 32: Průměrné hodnoty obsahu jednotlivých sacharidů (v μg na miligram sušiny) v protokormech *D. majalis* pěstovaných na médiích s různou koncentrací sacharózy a manitolu, rozdílná písmena značí statisticky významný rozdíl průměru zjištěný pomocí ANOVA a Tukey HSD testem nebo Kruskalovým-Wallisovým testem a párovým Wilcoxonovým testem (pro manitol), vzorky s počtem opakování menší než 3 nebyly zahrnuty, pro statistické zhodnocení obsahu manitolu byly sloučeny nulové hodnoty do jedné).

			Obsah endogenních rozpustných sacharidů [µg / mg sušiny]							
Sacharid v médiu		koncentrace [mM]	sacharóza	glukóza	fruktóza	manitol	neznámý sacharid 1	neznámý sacharid 2	neznámý sacharid 3	celkové cukry
5mM sacharóza	glutamin	0	46.09 ± 2.51 ^{b c}	0.54 ± 0.18 ^d	46.22 ± 0 ^{b c}	0	0	0	0	92.854 ± 24.452 ^{a b c}
		1	43.42 ± 1.18 ^{b c}	0.99 ± 0.09 ^d	44.32 ± 0 ^{b c}	1.79 ± 0 ^{a b c}	2.72 ± 0 ^a	0.89 ± 0 ^a	0	90.53 ± 16.483 ^{a b c}
		10	39.33 ± 0 ^{b c}	0.89 ± 0 ^d	42.34 ± 0 ^{b c}	17.55 ± 0 ^c	2.43 ± 0 ^a	1.01 ± 0 ^a	0	97.187 ± 15.196 ^c
		50	41.47 ± 0 ^{b c}	1.81 ± 0 ^d	39.42 ± 0 ^{b c}	85.97 ± 0 ^{a b c}	3.03 ± 0 ^a	0.58 ± 0 ^a	0.32 ± 0	171.604 ± 33.811 ^{a b c}
		100	32.38 ± 0 ^c	1.31 ± 0 ^d	32.38 ± 0 ^c	136.84 ± 0 ^{a b c}	3.17 ± 0 ^a	0	0.3 ± 0	202.926 ± 56.582 ^{a b c}
50mM sacharóza	glutamin	0	69.59 ± 1.73 ^a	10.01 ± 1.01 ^{b c}	73.11 ± 0.6 ^a	0	0	0	0	152.708 ± 31.57 ^{a b c}
		1	64.63 ± 3.14 ^a	10.19 ± 0.5 ^b	67.36 ± 0.52 ^a	1.018 ± 0.1 ^a	0.99 ± 0.25 ^a	0	0	143.201 ± 25.742 ^a
		10	74.14 ± 3.01 ^a	13.03 ± 0.42 ^a	77.31 ± 0.6 ^a	10.39 ± 0.7 ^b	1.5 ± 0.18 ^a	0	0	174.86 ± 27.983 ^b
		50	62.09 ± 4.61 ^a	11.72 ± 0.53 ^{a b}	64.89 ± 0.24 ^a	45.76 ± 3.44 ^{a b c}	2.08 ± 0.24 ^a	0.53 ± 0.08 ^a	0	184.462 ± 26.917 ^{a b c}
		100	46.69 ± 5.3 ^b	7.72 ± 1.02 ^c	49.42 ± 0.41 ^b	69.2 ± 3.4 ^{a b c}	1.42 ± 0.44 ^a	0.67 ± 0.12 ^a	0.8 ± 0.06	173.026 ± 25.203 ^{a b c}
p – hodnota			1.52E-10	<2e-16	4.13E-11	0.0005445	0.000609	0.006948	0.1	1.36E-10

8.5 Symbiotický výsev *D. majalis*

8.5.1 Růst protokormů

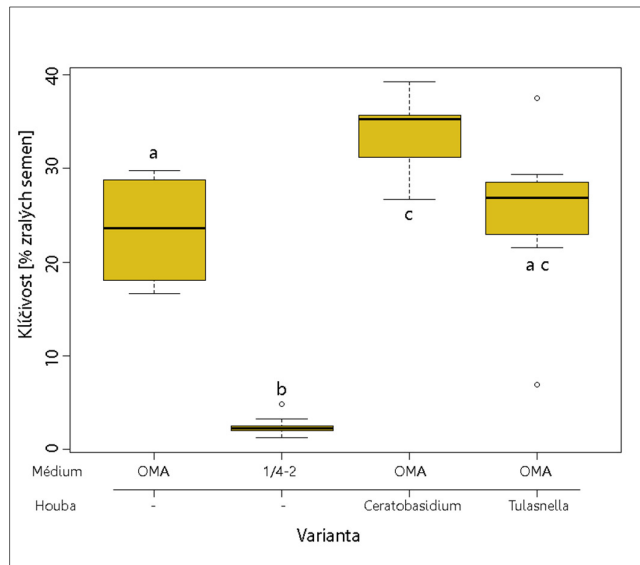
Hodnoceny byly všechny vyšetě misky, tj. 7 misek od každé symbiotické varianty, 8 pozitivní a 3 negativní kontroly. Symbioticky pěstované protokormy byly signifikantně větší než protokormy asymbioticky pěstované na stejném médiu (negativní kontrola) i než asymbiotické protokormy na komplexním médiu (pozitivní kontrola). Velikost protokormů se mezi dvěma houbovými izoláty nelišila (Graf 18).



Graf 18: Velikost symbioticky pěstovaných protokormů *D. majalis* se dvěma izoláty hub, negativní kontrola je bez hub na stejném médiu jako symbiotické varianty, pozitivní kontrola je na komplexním médiu a bez hub, rozdílná písmena značí signifikantní rozdíl mezi variantami zjištěný hierarchickou ANOVA a Tukey HSD testem po logaritmické transformaci dat, $p < 2e-16$.

8.5.2 Klíčivost

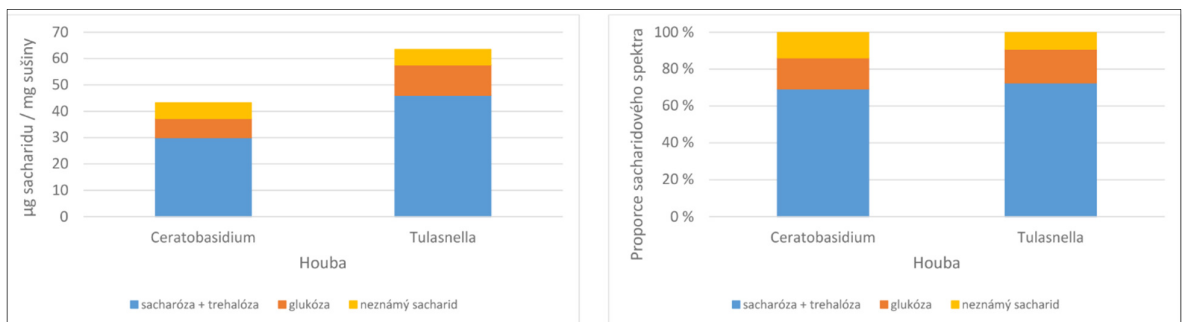
Semena na komplexním médiu pro asymbiotické kultivace 1/4-2 (pozitivní kontrola) měla výrazně nižší klíčivost, než na médiu pro symbiotické kultivace OMA bez houby (Graf 19). Semena kultivovaná symbioticky s mykorhizní houbou rodu *Ceratobasidium* měla vyšší klíčivost než na médiu OMA bez hub. V případě houby rodu *Tulasnella* byla klíčivost zvýšená jen velmi mírně a rozdíl nebyl statisticky průkazný.



Graf 19: Klíčivost (vyjádřená procentem vyklíčených semen ze všech zralých semen) semen *D. majalis* symbioticky dvěma izoláty hub, negativní kontrola je bez hub na stejném médiu jako symbiotické varianty, pozitivní kontrola je na komplexním médiu a bez hub, rozdílná písmena značí signifikantní rozdíly mezi variantami zjištěný Kruskalovým-Wallisovým testem a párovým Wilcoxonovým testem, $p = 0.0001509$.

8.5.3 Obsah endogenních rozpustných sacharidů

Proporce sacharidového spektra (Graf 20) mezi dvěma houbovými variantami se téměř nelišila. Protokormy rostoucí s houbou rodu *Tulasnella* však měly mírně vyšší celkový obsah rozpustných sacharidů než protokormy rostoucí s houbou rodu *Ceratobasidium*. Pro statistické vyhodnocení nebyl dostatečný počet vzorků.



Graf 20: Obsah endogenních rozpustných sacharidů v protokormech *D. majalis* symbioticky pěstovaných se dvěma různými izoláty hub, sacharóza s trehalózou nebyly chromatograficky rozlišitelné, pročež jsou uváděny dohromady.

8.5.4 Míra exprese SDH

Expresi sorbitoldehydrogenázy se nepodařilo vyhodnotit, neboť se mi nepovedlo získat ze symbioticky pěstovaných protokormů cDNA.

9 Diskuze

Pro porozumění orchideoidní mykorhize je pochopení přenosu C mezi houbou a rostlinou naprosto zásadní. Jednou z klíčových neznámých tohoto děje je povaha přenášených látek. Moje práce se zaměřuje zejména na cukerné alkoholy a možnosti jejich utilizace v semenáčcích orchidejí. Jednotlivé sacharidy proto z tohoto hlediska postupně pojednám v následujícím textu. V samostatné kapitole pak bude diskutován vliv aminokyseliny glutaminu, který byl rovněž testován jako potenciální postačující zdroj C pro protokormy. Zhodnoceny budou i možnosti přenosu všech zkoumaných látek v orchideoidní mykorhize. Na závěr následuje shrnutí látek testovaných v této práci i látek zmiňovaných literaturou a jejich vztahu k přenosu C v orchideoidní mykorhize.

9.1 Utilizace vybraných sacharidů orchidejovými protokormy

9.1.1 Arabitol

V mnoha publikacích je uváděno, že většina rostlin nedokáže využít arabitol. LaFayette a kolektiv (2005) dokonce využili tuto vlastnost pro tvorbu selekčního systému pro transformaci rýže (*Oryza sativa*). Do rostlin vnesli gen kódující arabitoldehydrogenázu z *E. coli*, a tím zajistili přeměnu arabitolu na xylulózu, kterou již rostlinné buňky dokáží využít. Zároveň tak bylo možné pozitivně selektovat transformované buňky na médiu obsahujícím jako zdroj sacharidů arabitol (LaFayette et al. 2005). Výsledky mé práce ukázaly, že protokormy *D. majalis* zřejmě arabitol pouze přijímaly, ale neutilizovaly. Protokormy dosáhly stejné velikosti, jako na médiu bez přidaného sacharidu, obsahovaly jen velmi malé množství rozpustných sacharidů a malé množství škrobu, což rovněž svědčí o nedostatku zdroje energie. Jestli a jak funguje arabitol v mykorhizách není prozkoumáno. Je známo, že se vyskytuje v houbách, a to o poznání častěji než v rostlinách. Jeho role je zde převážně spojována se stresem způsobeným nízkými teplotami (Tibbett et al. 2002). Rovněž bylo navrženo, že by mohl mít podíl na fytopatogenním účinku, neboť může sloužit jako osmotikum v boji houby s rostlinou o vodu (Clark et al. 2003). Lze tedy spekulovat, že by v mykorhizních symbiózách mohl fungovat podobně. Jeho role jako zdroj uhlíku pro *D. majalis* v mykorhizní symbióze se zdá nepravděpodobná.

9.1.2 Erythritol

Údaje o schopnosti rostlin využít erythritol nejsou zcela jednoznačné. Když byl radioaktivně značený erythritol v roztoku vpichem vpravován do rostlin pšenice, byla zaznamenána jeho částečná přeměna na neznámou látku blíže neurčené povahy (Gaunt &

Manners 1972), což by mohlo naznačovat možnost jeho utilizace v rostlinách. Erythritol urychloval růst rostlin huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) i růst a klíčení česneku (*Allium sativum*) (Kuroda et al. 2008). Výsledky mojí práce ukazují na neschopnost protokormů *D. majalis* a *A. morio* erythritol využít. Velikost protokormů a klíčivost se nelišily od kontroly bez rozpustných sacharidů ani v jednom z testovaných druhů. Obsahy sacharózy a fruktózy v *D. majalis* odpovídaly protokormům na arabitolu, podobné bylo i procentuální zastoupení arabitolu a erythritolu. Protokormy rostoucí na erythritolu obsahovaly i glukózu, která v protokormech na arabitolu nebyla detekována. Rozdíl v působení erythritolu na orchideje oproti huseníčku a česneku může být způsobený rozdílným účinkem erythritolu na různé skupiny organismů. Rozdíly mohou být také způsobeny použitím odlišných koncentrací erythritolu. Erythritol v koncentraci 20 mM v médiu (tj. hmotnostní koncentrace 0.24%) urychloval růst rostlin huseníčku (*Arabidopsis thaliana*). V hmotnostních koncentracích 0.01%, 0.05% v půdě také zvyšoval nárůst a urychloval klíčení česneku (*Allium sativum*). Při vyšších koncentracích (hmotnostní koncentrace 0.5%) však erythritol působil na růst inhibičně, při 5% koncentraci již byl úplně zastaven růst prýtu (Kuroda et al. 2008). Hmotnostní koncentrace použitá pro testování efektu erythritolu na protokormy v naší práci byla v tomto světle relativně vysoká (1.22 %). Proto možná není překvapivé, že erythritol měl na růst protokormů a na klíčivost semen obou orchidejových druhů negativní účinek. Kuroda a kolektiv spekulují, že inhibiční účinek vyšších koncentrací erythritolu by mohl být způsoben ovlivněním hladiny některého z fytohormonů, podobně jako manitol může snižovat hladinu etylénu (Imaseki & Watanabe 1978). Pozitivní efekt nízkých koncentrací erythritolu na růst a klíčení však zřejmě není zapříčiněn erythritolem jako zdrojem uhlíku. Autoři navrhuji, že by tento efekt mohl být zapříčiněn osmotickými vlastnostmi erythritolu, které by mohly usnadňovat příjem vody (Kuroda et al. 2008). Takový pozitivní účinek erythritolu by se v mém uspořádání experimentu patrně neprojevil, protože protokormy neměly k dispozici jiný zdroj uhlíku a energie. Je tedy také možné, že při kombinaci erythritolu s jiným dobře užitelným sacharidem by se jeho pozitivní efekt projevil. V *A. thaliana* byly nalezeny transportéry polyolů, které přenášejí široké spektrum cukerných alkoholů (sorbitol, xylitol, glycerol i erythritol) (Klepek et al. 2005). Zda se takové transportéry nalézají i u orchidejí, se neví. Jak by se erythritol do rostlin dostával, tedy zatím není jasné. Jiné zprávy o erythritolu jako možném zdroji uhlíku pro rostliny chybí, jeho takováto funkce se zdá spíše nepravděpodobná.

9.1.3 Glycerol

Glycerol byl nalezen v různých druzích hub i rostlin (Lewis & Smith 1967a) včetně AM hub rodu *Glomus* (Becard et al. 1991). Proto by se dalo předpokládat, že by se glycerol mohl uplatňovat v interakcích rostlin a hub. Při testování růstu mykoheterotrofní orchideje *Galeola septentrionalis* byl glycerol shledán jako vhodný zdroj uhlíku pro růst protokormů (Nakamura 1982), je ovšem nutné zdůraznit, že v této studii byly testované sacharidy v médiu vždy společně s glukózou, pročež výsledky nejsou dobře srovnatelné s našimi. V mém pokusu rostly protokormy *D. majalis* na glycerolu lépe než na kontrolním médiu bez rozpustných sacharidů. Obsahovaly rovněž velké množství sacharózy, glukózy i fruktózy, což naznačuje, že *D. majalis* může glycerol utilizovat také. Protokormy *A. morio* rostoucí na glycerolu nevykazovaly větší růst než kontrola bez rozpustných sacharidů, klíčivost semen se od této kontroly rovněž nelišila. Je tedy možné, že se odpověď na glycerol liší mezi různými druhy samotných orchidejí. V několika druzích rostlin byly identifikovány akvaporiny, které dokáží přenášet glycerol a jejichž exprese je ovlivněna mykorhizní kolonizací AM houbami (Bárzana et al. 2014). Mimoto může být v rostlinách glycerol zřejmě transportován i výše zmiňovanými polyolovými transportéry, jejichž rozšíření v rostlinách zatím také není zmapováno (Klepek et al. 2005). Bylo by proto možné pouze spekulovat, že glycerol je přenášen z mykorhizních hub do orchidejových protokormů některou podobnou transportní cestou. Z mého experimentu však vyplývá, že protokormy rozpustné sacharidy vzniklé utilizací glycerolu spíše akumulují, než využívají. Protokormy *D. majalis* na glycerolu totiž obsahovaly výrazně nejvíce rozpustných sacharidů ze všech testovaných variant (pokud pomineme variantu se sukralózou, u které docházelo k akumulaci sukralózy) a zároveň jen velmi málo škrobu. Množství škrobu odpovídalo variantám s nemetabolizovatelným arabitolem a s erythritolem. To by mohlo souviset s dříve pozorovaným inhibičním efektem glycerolu na některé enzymy rostlinného sacharidového metabolismu. V práci Weddinga a Harleyho (1976) byl testován vliv polyolů houbového původu na enzymy sacharidového metabolismu (glukóza-6-fosfátdehydrogenáza, hexokináza, fosfoglukózaizomeráza a další) izolované z mykorhizních kořenů buku (*Fagus sylvatica*). Ukázalo se, že některé z cukerných alkoholů mají na tyto enzymy inhibiční efekt (Wedding & Harley 1976). Podobné výsledky ukázala již dřívější práce, kde byl zkoumaným cukerným alkoholem právě glycerol. Při 30% koncentraci měl inhibiční účinek na celou řadu enzymů, mimo jiné se jednalo o alkoholdehydrogenázu, aldolázu, glutamátdehydrogenázu, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu či sorbitoldehydrogenázu (Myers & Jakoby 1973). Dalo by se proto uvažovat, že námi pozorovaný efekt glycerolu na protokormy je způsoben inhibicí některých enzymů uhlíkového metabolismu.

9.1.4 Xylitol

Xylitol se nachází v malých množstvích v mnohých rostlinných plodech. Můžeme ho nalézt například v hruškách, jahodách nebo dýních (Washüttl et al. 1973; Hyvönen et al. 1982). Fyziologická funkce xylitolu v rostlinách zatím zůstává neznámá, stejně tak nejsou zprávy ani o jeho utilizaci v rostlinách. Protokormy *D. majalis* xylitol zřejmě utilizovaly. Protokormy obsahovaly spíše nižší celkové množství sacharidů, které však bylo stále o poznání vyšší než u kontroly bez rozpustných sacharidů. Jejich obsah škrobu patřil mezi variantami spíše k vyšším, což naznačuje, že protokormy netrpěly nedostatkem energie. *D. majalis* i *A. morio* rostly na médiu s xylitolem lépe než na kontrolním médiu bez rozpustných sacharidů. Klíčivost měly stejnou (*D. majalis*) nebo vyšší (*A. morio*) než kontrolní varianta bez rozpustných sacharidů. V houbách byl xylitol nalezen v řadě druhů (Chiang & Knight 1960; Sampaio et al. 2003). Poznatky o jeho případném výskytu a funkci v mykorhizách chybí. Xylitol, jako častý houbový sacharid, by podle výsledků mého experimentu pravděpodobně mohl sloužit jako zdroj C pro orchidejové protokormy. Zároveň je však výrazně horším zdrojem energie a C než sacharóza, pravděpodobně tak nebude sloužit jako jejich hlavní transportní forma v orchideoidní mykorhize. Co se týče jeho transportérů, byly v *Arabidopsis thaliana* identifikovány a popsány přenašeče z podrodiny POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTER (PMT), AtPMT1 a AtPMT2. Oba tyto přenašeče vykazovaly preferenční přenos pro fruktózu a xylitol, navzdory tomu, že v *A. thaliana* nebyly nalezeny výraznější hladiny xylitolu (Klepek et al. 2010). V rostlině *Lotus japonica* byl nalezen H⁺ symportér specifický pouze pro xylitol (Kalliampakou et al. 2011), jehož nejvyšší míra exprese odpovídala místům s největší koncentrací xylitolu v rostlině. Tímto ovšem výčet poznatků o xylitolových transportérech v rostlinách končí. Jak je vidět, pro konkrétnější závěry je xylitol dosud příliš málo prozkoumán. Pro pochopení jeho významu v orchideoidní mykorhize bude důležité zejména poznání jeho fyziologických funkcí v rostlinách, klíčové bude i prohloubení znalostí o jeho transportérech v rostlinách a houbách.

9.1.5 Manitol

Manitol má v rostlinách mnoho různých funkcí (viz kapitolu 6.4.1). Jeho role v orchideoidní mykorhizní symbióze není jasná, ačkoli je jako jeden z významných houbových sacharidů zkoumán již dlouho. Ačkoli je manitol obecně považován za orchidejemi neutilizovaný, ve výše zmiňovaných pracích s asymbioticky pěstovanými protokormy (viz kapitolu 6.3.4), se efekt manitolu na semenáčky ukazoval do velké míry nejednoznačný: řada prací sice uvádí, že manitol není utilizován (Purves & Hadley 1976; Rasmussen 1995; Smith 1973), existují i práce,

ve kterých orchidejové protokormy na médiích s manitolem do jisté míry rostly (např. Ernst 1967). V literatuře bývá zmiňována i práce s nezelenou orchidejí *Galeola septentrionalis*, která v experimentu rostla na manitolu dobře (Nakamura 1982). *G. septentrionalis* proto bývá uváděna jako výjimka mezi orchidejemi, která manitol jasně využívá. V mém experimentu manitol zřejmě nebyl využíván, neboť jeho proporce v sacharidovém spektru protokormů se zvyšovala s jeho koncentrací v médiu, zatímco ostatní sacharidy zůstávaly na víceméně stejné úrovni. Velikost protokormů ani klíčivost *D. majalis* samotný manitol nezvýšil. Vysoká koncentrace manitolu měla dokonce negativní efekt na oba parametry. V experimentu, kde byla houbám *Rhizoctonia solani* podávána glukóza s radioaktivně označeným C, byla zaznamenána radioaktivně značená malá proporce manitolu v mykorhizách, které tato houba tvořila s protokormy *Dactylorhiza purpurella*. Manitol byl v této studii ve větším množství nalezen pouze u jedné houby z testovaných tří druhů, autorka proto uzavírá, že je nepravděpodobné, že by se manitol výrazně podílel na transportu sacharidů do protokormů (Smith 1967). Manitol vykazoval zvláštní chování v experimentech s *Ophrys eleonora* i s *D. majalis*. Protokormy manitol akumulovaly v množství takovém, že celkové množství cukrů bylo větší než v protokormech rostoucích na jiných sacharidech (Ponert et al. 2011; Ponert, nepublikováno). Tento jev se v našem experimentu potvrdil při vysokých koncentracích manitolu, kdy protokormy rostoucí na 300mM manitolu obsahovaly téměř o třetinu více endogenních sacharidů, z nichž ovšem převážnou většinu tvořil manitol. K akumulaci manitolu docházelo i na médiích s manitolem a sacharózou. Při 5mM hladině sacharózy však manitol v koncentracích 1, 10 a 100mM zvyšoval klíčivost (ne však na 50mM manitolu). Na 50mM hladině sacharózy manitol zvyšoval klíčivost v koncentracích 10, 50 a 100mM. Tyto výsledky víceméně odpovídají práci s orchidejí *Bletia purpurea*. U té byla na 1 a 10mM sacharóze nebo fruktóze za přítomnosti manitolu pozorována zvýšená klíčivost (Johnson & Kane 2013). Johnson a Kane navrhuji, že je manitol do protokormů transportován po koncentračním spádu a osmoticky zde podporuje příjem vody. To by mohl být případ i *D. majalis*. Transportéry manitolu byly charakterizovány v celeru (*Apium graveolens*, Noiraud et al. 2001) a olivě (*Olea europaea*, Conde et al. 2007). Přenašeče pro transport manitolu by orchideje zřejmě mít mohly také, jak naznačila výše zmiňovaná práce Smith & Smith (1973), ve které kousky listů *B. hyacinthina* přijímaly manitol a akumulovaly jej v koncentracích vyšších než v okolním roztoku. Transport manitolu jako zdroje C v orchideoidní mykorhize *D. majalis* se ale jeví jako nepravděpodobný.

9.1.6 Sorbitol

Sorbitol nebyl v souvislosti s orchideoidní mykorhizou zkoumán tolik jako manitol, neboť není typickým houbovým sacharidem. Jeho výskyt v houbách byl dosud zaznamenán spíše ojediněle (viz kapitolu 6.4.2). Nemnohé experimenty, ve kterých byl testován jeho efekt na protokormy však přinesly poznatky vesměs rozporuplné. Výše zmiňovaná *G. septentrionalis* rostla na sorbitolu podobně jako na manitolu a dalších cukerných alkoholech (Nakamura 1982). Sorbitol naopak nepodporoval klíčení semen *Bletia purpurea*, ve vyšších koncentracích v kombinaci se sacharózou či fruktózou naopak zpomaloval vývoj protokormů (Johnson & Kane 2013). V mém experimentu byla velikost protokormů *D. majalis* i *A. morio* rostoucích na sorbitolu větší než na kontrolním médiu bez rozpustných sacharidů. Klíčivost obou druhů se od této kontroly nelišila. Obsah endogenních sacharidů však byl znatelně vyšší než u kontroly. Procentuální zastoupení sacharózy a glukózy v protokormech *D. majalis* bylo srovnatelné s variantami s glycerolem, xylitolem, manózou a sacharózou, fruktóza ve spektru ale chyběla. Zdá se tedy, že protokormy obou druhů sorbitol utilizovat dokáží. V nedávné době byla provedena velká transkriptomická studie na orchideji *Cymbidium* × *hybridum*, ve které byly pomocí metod sekvenování nové generace mimo jiné nalezeny i geny odlišně exprimované v mykorhizních kořenech. Mezi nimi byl zaznamenán i gen pravděpodobně kódující transportér sorbitolu (Zhao et al. 2014). Je proto možné, že se sorbitol do protokormů dostává právě takovýmito transportéry. Jaký by mohl být význam přenosu sorbitolu v orchideoidní symbióze není jasné, neboť sorbitol není obecně považován za významný houbový sacharid a zprávy o jeho výskytu v houbách jsou dosud spíše výjimečné.

9.1.6.1 Role sorbitoldehydrogenázy

SDH z *D. majalis*, jejíž částečnou sekvenci se mi podařilo získat, byla exprimována v protokormech rostoucích na různých sacharidech ve velice podobné míře. Pro statistické vyhodnocení rozdílů v míře exprese jsem bohužel neměla dostatek vzorků, tyto výsledky jsou proto pouze orientační a pro další závěry by bylo nutné experimenty zopakovat. O trochu více byla zřejmě ve variantách na xylitolu a erythritolu (nad 90 % míry exprese aktinu), v ostatních variantách se míra exprese pohybovala od 75 do 90 % míry exprese aktinu. To by mohlo souviset s vyšší konstantou specifity pro xylitol než pro další substráty (sorbitol a ribitol), která byla zaznamenána při testování *in vitro* aktivity SDH z *A. thaliana* (Aguayo et al. 2015). Ať tak či onak, míra exprese SDH zřejmě není výrazně závislá na sacharidu poskytnutém v médiu. SDH byla při porovnání s aktinem exprimována relativně hodně. To mohlo být způsobeno horší účinností PCR s primery pro aktin, které nebyly dostatečně specifické pro *D.*

majalis. Na druhou stranu vysoká míra exprese SDH byla zaznamenána i u rajčete (*Lycopersicon esculentum*), které nepatří mezi rostliny využívající sorbitol jako primární produkt fotosyntézy (Ohta et al. 2005). Je možné, že vzhledem k široké specificitě enzymu, SDH v orchidejích zpracovává nejen sorbitol, ale i další cukerné alkoholy. Také je možné, že se účastní nějakých vnitřních metabolických procesů nezávislých na dodání sacharidů zvenčí. U orchidejí rodu *Phalaenopsis* jsem identifikovala dvě skupiny SDH. Jediná sekvence získaná z *D. majalis* spadá do jedné ze dvou zmíněných skupin. Lze proto předpokládat, že k duplikaci SDH došlo orchidejí dříve, než k oddělení rodů *Phalaenopsis* a *Dactylorhiza*. Tyto dva rody jsou evolučně poměrně vzdálené a k jejich oddělení došlo přibližně na přelomu křídly a terciéru (před zhruba 64 milióny let (Givnish et al. 2015)). Je proto možné, že většina orchidejí včetně *D. majalis* by mohla obsahovat ještě zástupce druhé skupiny orchidejových SDH. Tato druhá SDH by pak mohla reagovat na externí sorbitol či jiné cukerné alkoholy.

9.1.7 Manóza

Manóza byla jako zdroj sacharidů zkoumaná již v počátcích experimentování s utilizací sacharidů protokormy (Knudson 1924; Wynd 1933). V pozdějších pracích se však příliš neobjevuje. Vzhledem ke snaze, vyvíjené v naší laboratoři, o otestování co největšího množství houbových sacharidů (Ponert, nepublikováno), byla manóza zkoumána i v této práci, přestože se nejedná o cukerný alkohol. Mimoto nebyla nikdy testována na modelovém organismu *D. majalis*. Knudson (1924) ve své práci pozoroval semenáčky orchideje rodu *Cattleya* rostoucí na manóze dobře vyvinuté a „napěchované“ škrobem. V experimentech Wynda (1933) rostly protokormy *Cattleya trianae* na manóze lépe než na všech ostatních sacharidech (sacharóze, glukóze, maltóze, fruktóze a rafinóze). Ernst et al. rovněž pozorovali pozitivní vliv manózy na růst protokormů rodu *Phalaenopsis* (1970). Fonnensbech (1972) shledal ve svém experimentu se semenáčky rodu *Cymbidium* manózu jako utilizovanou, ačkoli fruktóza, sacharóza, glukóza a maltóza podporovaly růst protokormů výrazně více. Protokormy *D. majalis* rostoucí na manóze byly v mém experimentu druhé největší, u *A. morio* byly protokormy dokonce největší ze všech testovaných variant. Klíčivost měly oba druhy sniženou oproti kontrole bez rozpustných sacharidů, ale pouze u *D. majalis* bylo toto snížení statisticky významné. Zároveň protokormy obsahovaly škrobu nejvíce ze všech variant a přibližně stejné množství rozpustných sacharidů jako protokormy pěstované na sacharóze, která je považována pro protokormy za snadno utilizovaný sacharid. Z těchto výsledků a předchozích prací s manózou lze předpokládat, že se jedná o sacharid orchidejovými protokormy poměrně dobře utilizovatelný, jeho efekt je však zřejmě do jisté míry druhově závislý.

Manóza je častý houbový sacharid, byla shledána jako utilizovatelná i pro OM houby (Rasmussen 1995). O samotném přenosu manózy v orchideoidní mykorhize nejsou podobně jako u výše zmíněných sacharidů žádné zprávy. Existují však alespoň zprávy o transportérech v jiných mykorhizních asociacích. V AM houbách rodu *Glomus* byly nalezeny MST2 transportéry, jejichž míra exprese se zvyšovala zároveň s mírou exprese transportéru pro fosfor PT4, který je považován za nejlepší indikátor AM kolonizace (Harrison et al. 2002). MST2 transportér při testování specifity prokázal schopnost transportovat glukózu, xylózu, manózu a fruktózu s afinitou klesající v tomto pořadí (Helber et al. 2011). Dále byly nalezeny hexózoové transportéry v ektomykorhizní houbě *Laccaria bicolor*, kterými byla preferenčně přenášena glukóza, při přidání manózy se transport glukózy snížil. To by sice mohlo naznačovat kompetici glukózy s manózou o přenašeč, zda to však znamená i transport samotné manózy, nelze určit (Fajardo López et al. 2008). Všechny tyto studie a asociací se však zabývají pouze možností přenosu ve směru z rostliny do houby. V orchideoidní mykorhize se však tomuto směru přenosu nevěnuje skoro žádná pozornost. Na základě dosud získaných informací by manóza mohla být jedním z transportovaných sacharidů v orchideoidní mykorhize. Je ale dobře utilizovatelná oběma partnery a na základě dostupných dat nelze určit, kterým směrem by k transportu docházelo. Pro rozsáhlejší úsudky ohledně její funkce je proto třeba dalšího výzkumu.

9.1.8 Sukralóza

Sukralóza (1,6-dichloro-1,6-dideoxy- β -D-fruktofuranosyl-4-chloro-4-deoxy- α -D-galaktopyranosyl) je obecně považována za buňkami nezpracovatelnou. V rostlinách byla tato představa ověřována u *A. thaliana*, kde se skutečně projevila jako nemetabolizovaná. Rostliny rostoucí v hydroponické kultuře s médiem obsahujícím sukralózu, tuto snadno transportovaly z kořenů do listů a zde akumulovaly (Matros et al. 2015). Kromě toho byly v *A. thaliana* identifikovány sacharózoové transportéry schopné přenosu sukralózy (Sivitz et al. 2006). Ve své práci jsem proto testovala, zda je sukralóza do orchidejí transportována a zda ji protokormy dokáží využít. Protokormy *D. majalis* rostoucí na sukralóze byly menší než na kontrolním médiu bez rozpustných sacharidů, u *A. morio* byly srovnatelné s touto kontrolou. Klíčivost byla u obou druhů snížena oproti kontrole bez rozpustných sacharidů. Sukralóza byla *D. majalis* akumulována a byla jediným detekovatelným sacharidem v protokormech. Její celkový obsah v protokormech byl vyšší než obsah celkových cukrů ve všech ostatních variantách, zároveň představoval více než trojnásobek celkových cukrů v protokormech rostoucích na sacharóze.

D. majalis ani *A. morio* tedy podle všeho sukralózu neutilizují. Toto zjištění otevírá další možnosti výzkumu a odlišení signální úlohy sacharózy od jejích metabolických produktů.

9.2 Utilizace glutaminu orchidejovými protokormy

Zatímco příjem N z aminokyselin byl zkoumán a dokládán velmi intenzivně u různých typů mykorhizních symbióz, aminokyseliny jako zdroj C byly trochu opomíjeny. V ektomykorhizních semenáčcích borovice (*Pinus sylvestris*) byl sledován příjem dvojité značeného glycinu. ^{13}C byl spolehlivě detekovatelný v mykorhizních kořenech, výsledky zkoumání jeho transportu do nadzemní části však nebyly přesvědčivé (Taylor et al. 2004). Podobné experimenty byly prováděny i na orchideoidně mykorhizních rostlinách (viz kapitulu 6.3.4.2.2), jejichž výsledky jsou nesourodé. Ve svém experimentu jsem testovala, zda je glutamin postačujícím zdrojem C podobně jako výše uvedené sacharidy. Velikost protokormů byla u obou druhů výrazně snížena. Klíčivost byla u *D. majalis* nižší, u *A. morio* stejná jako u kontrolní varianty bez rozpustných sacharidů. Samotný glutamin tedy požadavek na dodání rozpustného sacharidu nenahrazuje. Dále jsem testovala, jaký je efekt glutaminu při jeho různých koncentracích. Velikost protokormů se při různých koncentracích nelišila od negativní kontroly bez rozpustných sacharidů, klíčivost byla oproti kontrole zvýšená u nízkých koncentrací glutaminu a snížena při vysokých koncentracích. Obsahy sacharidů v protokormech se příliš nelišily, rozdíly však nebyly statisticky vyhodnotitelné. Rozdíly v klíčivosti na základě dostupných informací nelze vysvětlit. Velikost protokormů však jasně ukazuje, že ani při odlišných koncentracích glutamin nenahrazuje rozpustné sacharidy. Nakonec jsem zkoumala, zda se efekt různých koncentrací glutaminu nezmění za přítomnosti dobře utilizovaného sacharidu, sacharózy. Při 1mM koncentraci glutaminu a 10mM sacharózy byly protokormy větší než na samotné sacharóze, vyšší koncentrace glutaminu měly na velikost opět negativní efekt. Klíčivost byla na všech koncentracích glutaminu v kombinaci s 10mM sacharózou nižší než na samotné 10mM sacharóze. Větší velikosti protokormů při 1mM glutaminu kombinovaným s 10mM sacharózou nelze z dostupných informací vysvětlit, všechny ostatní varianty rostoucí na glutaminu však naznačují, že glutamin není utilizovatelný. Obsahy endogenních sacharidů se výrazně nelišily od protokormů na 10mM sacharóze. Zdá se tedy, že glutamin není protokormy *D. majalis* využíván jako významný zdroj energie a C. V nižších koncentracích má jisté indukční účinky na klíčivost, možná zde působí jako zdroj N. Požadavek na dodání rozpustného sacharidu pro *D. majalis* glutamin plnohodnotně nahradit nemůže.

9.3 Přenos C v orchideoidní mykorhize

Z výše uvedeného lze shrnout, že ze zkoumaných cukerných alkoholů by v orchideoidní mykorhize by mohly být z hub do protokormů přenášeny a jako zdroj C používány glycerol, xylitol a sorbitol. Jako spíše nepravděpodobné pro tuto funkci se zdají být arabitol, erythritol a manitol. Jako využitelná se projevila i manóza. Zajímavá je zejména situace u sorbitolu, který nepatří mezi typické houbové sacharidy. Společně s glycerolem a xylitolem jsou ale podle všeho látkami zasluhující další výzkum přenosu C mezi houbou a protokormem. Ačkoli již z tohoto pohledu byly zkoumány například glukóza, fruktóza, maltóza nebo rafinóza, které jsou rovněž relativně dobře využívány (Ponert 2009; Ponert, nepublikováno), zůstává toto téma z větší části neprobádané. Jedinou více diskutovanou látkou, která je zároveň nejsilnějším kandidátem na titul transportní formy C v orchideoidní mykorhize, je trehalóza. Tento disacharid, příznačný pro houby, je orchidejovými protokormy dobře využíván (Ernst et al. 1971; Smith 1973), včetně *D. majalis* (Ponert, 2009; Ponert, nepublikováno). Kromě toho byl zaznamenán i v translokačních studiích s ^{14}C , kde byl prvním sacharidem, který se stal značeným. Podíl značky pak klesal, zatímco další sacharidy, zejména sacharóza, značku přijímaly (Smith, 1967). V jaké podobě se trehalóza do rostlin dostává, však není jasné. Není vyloučené, že je trehalóza na mykorhizním rozhraní rozkládána trehalázou na glukózu. Glukóza samotná je pak dalším houbovým sacharidem, který by mohly protokormy přijímat. Rovněž je protokormy velmi dobře využitelná (Smith, 1973), evidence kolem přenosu glukózy však není tak silná jako u trehalózy. Ačkoli se trehalóza zatím zdá jako nejpravděpodobnější sacharid transportující C v orchideoidní mykorhize, je možné, že transport mezi houbami a protokormy nezajišťuje jedna látka, ale že se na něm podílí více složek najednou.

10 Závěr

Mykorhizní symbióza je dlouhou dobu zkoumaný fenomén, který je dodnes v mnoha ohledech neprobádaný. Jako u všech symbióz se jedná o experimentálně velmi obtížně uchopitelný systém. Proto jsou látky putující mezi houbami a rostlinami i způsob jejich přenosu objevovány pouze po malých krůčcích, ač mykorhizní symbióza představuje zcela zásadní prvek života mnohých rostlin i zájmu rostlinných biologů. Orchideje jsou na mykorhizní symbióze závislé více než většina jiných rostlin, neboť orchidejové protokormy jsou v časných fázích svého vývoje plně heterotrofní. V přírodě jim zdroj energie zajišťují právě symbiotické houby. Podíváme-li se na různé druhy mykorhizních symbióz, zjistíme, že orchideoidní mykorhizní symbióza je jedna z méně prozkoumaných. Zároveň je výjimečná v tom smyslu, že energie v podobě uhlíkatých látek proudí (alespoň v počátcích života orchidejí) z hub do rostlin. Zda, případně do jaké míry, se tento tok obrací v pozdějších fázích vývoje těchto rostlin, je stále předmětem výzkumu i dohadů. Další zásadní neznámou tohoto procesu je i identita přenášených uhlíkatých látek, nejpravděpodobněji sacharidů.

Z výsledků této práce vyplývá, že arabitol, erythritol a manitol nejsou zkoumanými orchidejemi využívány, zatímco xylitol, glycerol, sorbitol a manóza jsou. Dřívější práce identifikovaly jako další utilizovatelné rozpustné sacharidy houbového původu glukózu, fruktózu a trehalózu. Spektrum sacharidů, které by hypoteticky mohly být přenášeny v orchideoidní mykorhize je tedy poměrně široké. Některé výsledky ukazují na roli trehalózy v tomto přenosu. Ta je však dosud jediným sacharidem, který byl v tomto smyslu podrobněji studován. Pro určení úlohy ostatních sacharidů je nezbytné další studium.

Na základě dostupných sekvencí jsem v orchidejích identifikovala tři hluboce oddělené skupiny manitoldehydrogenáz a dvě skupiny sorbitoldehydrogenáz. Z modelového druhu *D. majalis* se však podařilo získat pouze jedinou sekvenci sorbitoldehydrogenázy, jejíž exprese na poskytnuté sacharidy nereagovala. O enzymech orchidejí zapojených v utilizaci cukerných alkoholů a jejich případném zapojení v mykorhizní symbióze lze proto pouze spekulovat. Jestli se cukerné alkoholy přímo účastní přenosu uhlíku v orchideoidní mykorhizní symbióze, by se mohlo ukázat s dalším výzkumem zaměřeným zejména na enzymy jejich metabolismu a transportní cesty.

11 Příloha

Tabulka 33: Průměrné počty a směrodatné odchylky (*standard deviation*, sd) změřených protokormů pro pokus s různými sacharidy a glutaminem

Efekt sacharidů a glutaminu					
<i>D. majalis</i>			<i>A. morio</i>		
složka v médiu	průměr	sd	složka v médiu	průměr	sd
kontrola	33.38	13.62	kontrola	33.38	13.62
arabitol	46.78	23.40	arabitol	46.78	23.40
erythritol	72.78	21.99	erythritol	72.78	21.99
glutamin	0.44	0.53	glutamin	0.44	0.53
glycerol	96.57	39.53	glycerol	96.57	39.53
manóza	50.89	19.80	manóza	50.89	19.80
sacharóza	39.11	23.40	sacharóza	39.11	23.40
sukralóza	96.25	48.57	sukralóza	96.25	48.57
sorbitol	73.33	42.48	sorbitol	73.33	42.48
xylitol	126.00	77.22	xylitol	126.00	77.22

Tabulka 34: Průměrné počty a směrodatné odchylky (*standard deviation*, sd) změřených protokormů pro pokus s glutaminem a sacharózy

Efekt glutaminu			
složka v médiu	mM koncentrace	průměr	sd
glutamin	0	51.43	14.37
	0.1	89.63	41.89
	1	99.00	31.87
	10	21.43	8.02
	30	1.00	-
sacharóza	0.1	114.57	12.18
	1	77.33	18.67
	10	72.86	23.77
	30	66.00	24.74
10mM sacharóza + glutamin	0.1	51.63	27.94
	1	53.33	8.16
	10	22.71	9.14

Tabulka 35: Průměrné počty a směrodatné odchylky (*standard deviation*, sd) změřených protokormů pro pokus s manitolem

Efekt manitolu a sacharózy			
složka v médiu	mM koncentrace	průměr	sd
5mM sacharóza + manitol	0	76.14	26.60
	1	90.29	32.06
	10	114.14	52.31
	50	84.00	57.52
	100	108.71	50.59
50mM sacharóza + manitol	0	42.29	17.43
	1	33.00	14.49
	10	57.33	12.99
	50	52.43	8.30
	100	54.33	18.25

Tabulka 36: Průměrné počty a směrodatné odchylky (*standard deviation*, sd) změřených protokormů pro pokus s manitolem a sacharózou

Efekt manitolu			
složka v médiu	mM koncentrace	průměr	sd
manitol	0	138.00	50.09
	1	144.00	60.80
	10	131.13	43.26
	50	200.43	15.34
	100	79.63	31.65
	300	188.25	38.50
sacharóza	0.5	157.13	118.52
	5	120.00	39.72
	25	102.29	56.89
	50	152.43	49.64
	150	43.00	34.70

Tabulka 37: Průměrné počty a směrodatné odchylky (*standard deviation*, sd) změřených protokormů pro pokus se symbiotický výsevem *D. majalis*

Symbiotický výsev <i>D. majalis</i>			
médium	houba	průměr	sd
1/4-2	-	7.22	4.02
OMA	-	56.75	61.71
OMA	Tulasnella	49.29	34.10
OMA	Ceratobasidium	55.86	26.17

12 Literární zdroje

- Abualghaith, A.** (2012) Carbon and nitrogen metabolism in orchid-mycorrhiza associations. Dizertační práce, University of Sheffield.
- Aguayo, M.F. et al.** (2015) Polyol specificity of recombinant *Arabidopsis thaliana* sorbitol dehydrogenase studied by enzyme kinetics and in silico modeling. *Frontiers in Plant Science*. **6**, 1–11.
- Aguayo, M.F. et al.** (2013) Sorbitol dehydrogenase is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*. **205-206**, 63–75.
- Alexander, C., Alexander, I.J. & Hadley, G.** (1984) Phosphate uptake by *Goodyera repens* in relation to mycorrhizal infection. *New Phytologist*. **97**, 401–411.
- Alexander, C. & Hadley, G.** (1985) Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. *New Phytologist*. **101**, 657–665.
- Arditti, J.** (1967) Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*. **33**, 1–97.
- Arditti, J. & Ghani, A.K.A.** (2000) Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*. **145**, 367–421.
- Balestrini, R. et al.** (1996) Differential Localization of Carbohydrate Epitopes in Plant Cell Walls in the Presence and Absence of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Physiol*. **111**, 203–213.
- Barroso, J. & Pais, M.S.S.** (1987) Coated vesicles in the cytoplasm of the host cells in *Ophrys lutea* Cav. mycorrhizas (Orchidaceae). *New Phytologist*. **105**, 67–70.
- Bárzana, G. et al.** (2014) New Insights into the Regulation of Aquaporins by the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in Maize Plants Under Drought Stress and Possible Implications for Plant Performance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **27**, 349–363.
- Bécard, G. et al.** (1991) Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by in vivo ¹³C NMR and HPLC analyses*. *New Phytologist*. **118**, 547–552.

- Benzing, D.H.** (1981) Why is Orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedlings mycotrophic? *Selbyana*. **5**, 241–242.
- Bernard, N.** (1909) Les Orchidées et leurs champignons commensaux. *Annales des sciences naturelles (Botanique)*. **9**, 1–196.
- Lo Bianco, R., Rieger, M. & Sung, S.-J.S.** (2000) Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sinks and sources of peach. *Physiologia Plantarum*. **108**, 71–78.
- Bidartondo, M.I. et al.** (2004) Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. **271**, 1799–1806.
- Bialeski, R.L.** (1982) Sugar Alcohols. V F. Loewus & W. Tanner, eds. *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 158–192.
- Bougoure, J. et al.** (2014) High-resolution secondary ion mass spectrometry analysis of carbon dynamics in mycorrhizas formed by an obligately myco-heterotrophic orchid. *Plant, Cell & Environment*. **37**, 1223–1230.
- Bougoure, J.J., Brundrett, M.C. & Grierson, P.F.** (2010) Carbon and nitrogen supply to the underground orchid, *Rhizanthella gardneri*. *New Phytologist*. **186**, 947–956.
- Briens, M. & Larher, F.** (1983) Sorbitol Accumulation in Plantaginaceae; Further Evidence for a Function in Stress Tolerance. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. **110**, 447–458.
- Cameron, D.D. et al.** (2008) Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist*. **180**, 176–184.
- Cameron, D.D. et al.** (2007) Mycorrhizal Acquisition of Inorganic Phosphorus by the Green-leaved Terrestrial Orchid *Goodyera repens*. *Annals of Botany*. **99**, 831–834.
- Cameron, D.D., Leake, J.R. & Read, D.J.** (2006) Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist*. **171**, 405–416.
- Charlson, A.J. & Richtmyer, N.K.** (1960) The Isolation of an Octulose and an Octitol from Natural Sources: D-glycer-D-manno-Octulose and D-erythro-D-galacto-Octitol from the Avocado and D-glycro-D-manno-Octulose from *Sedum* Species. *Journal of the American Chemical Society*. **82**, 3428–3434.

- Chase, M.W. et al.** (2015) An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **177**, 151–174.
- Chiang, C. & Knight, S.G.** (1960) Metabolism of D-Xylose by Moulds. *Nature*. **188**, 79–81.
- Chugh, S., Guha, S. & Rao, I.U.** (2009) Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*. **122**, 507–520.
- Clark, A.J., Blissett, K.J. & Oliver, R.P.** (2003) Investigating the role of polyols in *Cladosporium fulvum* during growth under hyper-osmotic stress and in planta. *Planta*. **216**, 614–9.
- Clements, M.A., Muir, H. & Cribb, P.J.** (1986) A Preliminary Report on the Symbiotic Germination of European Terrestrial Orchids. *Kew Bulletin*. **41**, 437–445.
- Conde, C. et al.** (2006) Utilization and Transport of Mannitol in *Olea europaea* and Implications for Salt Stress Tolerance. *Plant and Cell Physiology*. **48**, 42–53.
- Corina, D.L. & Munday, K.A.** (1971) Studies on Polyol Function in *Aspergillus clavatus*: a role for Mannitol and Ribitol. *Journal of General Microbiology*. **69**, 221–227.
- Dearnaley, J.D.W. & McGee, P.A.** (1996) An intact microtubule cytoskeleton is not necessary for interfacial matrix formation in orchid protocorm mycorrhizas. *Mycorrhiza*. **6**, 175–180.
- Downie, D.G.** (1940) On the Germination and Growth of *Goodyera repens*. *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh*. **33**, 36–51.
- Dressler, R.L.** (2005) How Many Orchid Species? *Selbyana*. **26**, 155–158.
- Elbein, A.D.** (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*. **13**, 17R–27R.
- Ercole, E. et al.** (2015) Establishment of a Symbiotic in vitro System between a Green Meadow Orchid and a Rhizoctonia-like Fungus. *bio-protocol*. **5**, 1–7.
- Ernst, R.** (1967) Effect of carbohydrate selection on the growth rate of freshly germinated *Phalaenopsis* and *Dendrobium* seed. *American Orchid Society Bulletin*. **36**, 1068–1073.
- Ernst, R., Arditti, J. & Healey, P.** (1970) The nutrition of orchid seedlings. *American Orchid Society Bulletin*. **39**, 559–565.

- Ernst, R., Arditti, J. & Healey, P.L.** (1971) Carbohydrate physiology of orchid seedlings. II. Hydrolysis and effects of oligosaccharides. *Botanical Society of America*. **58**, 827–835.
- Fajardo López, M. et al.** (2008) The sugar porter gene family of *Laccaria bicolor*: function in ectomycorrhizal symbiosis and soil-growing hyphae. *New Phytologist*. **180**, 365–378.
- Fellman, J.K. & Loescher, W.H.** (1987) Comparative studies of sucrose and mannitol utilization in celery (*Apium graveolens*). *Physiologia Plantarum*. **69**, 337–341.
- Fonnesbech, M.** (1972) Organic Nutrients in the Media for Propagation of *Cymbidium* in vitro. *Physiologia Plantarum*. **27**, 360–364.
- Fu, C.-H. et al.** (2011) OrchidBase: A Collection of Sequences of the Transcriptome Derived from Orchids. *Plant and Cell Physiology*. **52**, 238–243.
- La Garde, R. V.** (1929) Non-symbiotic germination of orchids. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **16**, 499–514.
- Gaunt, R.E. & Manners, J.G.** (1972) The production of trehalose and polyols by *Ustilago nuda* in culture and their utilization in healthy and infected wheat plants. *New Phytologist*. **72**, 321–327.
- Gebauer, G. & Meyer, M.** (2003) ¹⁵N and ¹³C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist*. **160**, 209–223.
- Gebauer, G., Preiss, K. & Gebauer, A.C.** (2016) Partial mycoheterotrophy is more widespread among orchids than previously assumed. *New Phytologist*. **211**, 11–15.
- Givnish, T.J. et al.** (2015) Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. **282**, 20151553.
- Gonçalves, L.M. et al.** (2012) Use of complex supplements and light-differential effects for micropropagation of *Hadrolaelia purpurata* (= *Laelia purpurata*) and *Encyclia randii* orchids. *Acta Scientiarum. Agronomy*, **34**, 459–463.
- Górka-Nieć, W. et al.** (2010) Influence of sorbitol on protein production and glycosylation and cell wall formation in *Trichoderma reesei*. *Fungal Biology*. **114**, 855–862.
- Gryndler, M. et al.** (2004) *Mykorhizní symbióza*, Praha: Academia.

- Guimarães, F.A.R. et al.** (2013) Symbiotic propagation of seedlings of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi (Orchidaceae). *Acta Botanica Brasilica*. **27**, 590–596.
- Guo, Z.-X. et al.** (2012) Cloning of NAD-SDH cDNA from plum fruit and its expression and characterization. *Plant Physiology and Biochemistry*. **57**, 175–180.
- Hadley, G. & Purves, S.** (1974) Movement of ¹⁴carbon from host to fungus in irchid mycorrhiza. *New Phytologist*. **73**, 475–482.
- Harrison, C.S.** (1977) Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantica* (Orchidaceae). *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **138**, 41–45.
- Harrison, M.J., Dewbre, G.R. & Liu, J.Y.** (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell*. **14**, 2413–2429.
- Harvais, G.** (1974) Notes on the biology of some native orchids of Thunder Bay, their endophytes and symbionts. *Canadian Journal of Botany*. **52**, 451–460.
- Helber, N. et al.** (2011) A Versatile Monosaccharide Transporter That Operates in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus* sp Is Crucial for the Symbiotic Relationship with Plants. *The Plant Cell*. **23**, 3812–3823.
- Hult, K. & Gatenbeck, S.** (1979) Enzyme activities of the mannitol cycle and some connected pathways in *Alternaria alternata*, with comments on the regulation of the cycle. *Acta Chemica Scandinavica*, B 33, 239–243.
- Hult, K. & Gatenbeck, S.** (1978) Production of NADPH in the Mannitol Cycle and Its Relation to Polyketide Formation in *Alternaria alternata*. *European Journal of Biochemistry*. **88**, 607–612.
- Hult, K., Veide, A. & Gatenbeck, S.** (1980) The Distribution of the NADPH Regenerating Mannitol Cycle Among Fungal Species. *Archives of Microbiology*. **128**, 253–255.
- Hyvönen, L., Koivistoinen, P. & Voirol, F.** (1982) Food Technological Evaluation of Xylitol. In *Advances in Food Research*. pp. 373–403.

- Imaseki, H. & Watanabe, A.** (1978) Inhibition of ethylene production by osmotic shock. Further evidence for membrane control of ethylene production. *Plant and Cell Physiology*. **19**, 345–348.
- Jennings, D.B. et al.** (1998) Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**, 15129–15133.
- Jennings, D.B.** (2000) The Role of Mannitol and Mannitol Dehydrogenase in Plant-Pathogen Interactions. Dizertační práce, North Carolina State University.
- Johnson, N.C., Graham, J.H. & Smith, F. a.** (1997) Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist*. **135**, 575–585.
- Johnson, T.R. & Kane, M.E.** (2013) Differential germination and developmental responses of *Bletia purpurea* (Orchidaceae) to mannitol and sorbitol in the presence of sucrose and fructose. *Journal of Plant Nutrition*. **36**, 702–716.
- Johnson, T.R., Kane, M.E. & Pérez, H.E.** (2011) Examining the interaction of light, nutrients and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae). *Plant Growth Regulation*. **63**, 89–99.
- Kalliampakou, K.I. et al.** (2011) Cloning and functional characterization of LjPLT4, a plasma membrane xylitol H(+)- symporter from *Lotus japonicus*. *Molecular Membrane Biology*. **28**, 1–13.
- Klepek, Y.S. et al.** (2010) *Arabidopsis thaliana* POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTERS 1 and 2: Fructose and xylitol/H⁺ symporters in pollen and young xylem cells. *Journal of Experimental Botany*. **61**, 537–550.
- Klepek, Y.-S. et al.** (2005) *Arabidopsis* POLYOL TRANSPORTER5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H⁺-Symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *The Plant cell*. **17**, 204–18.
- Knudson, L.** (1924) Further Observations on Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds. *Botanical Gazette*. **77**, 212–219.
- Knudson, L.** (1922) Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *The Botanical Gazette*. **73**, 1–25.

- Koivistoinen, O.M. et al.** (2012) Sorbitol dehydrogenase of *Aspergillus niger*, SdhA, is part of the oxido-reductive D-galactose pathway and essential for D-sorbitol catabolism. *FEBS Letters*. **586**, 378–383.
- Kuga, Y., Sakamoto, N. & Yurimoto, H.** (2014) Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pellets transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *New Phytologist*. **202**, 594–605.
- Kuroda, K. et al.** (2008) Growth acceleration of plants and mushroom by erythritol. *Plant Biotechnology*. **25**, 489–492.
- LaFayette, P.R. et al.** (2005) Arabitol dehydrogenase as a selectable marker for rice. *Plant Cell Reports*. **24**, 596–602.
- Leake, J.R.** (1994) The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist*. **127**, 171–216.
- Lewis, D.H. & Smith, D.C.** 1967a. Sugar Alcohols (Polyols) in Fungi and Green Plants. I. Distribution, Physiology and Metabolism. *New Phytologist*, **66**, 143–184.
- Lewis, D.H. & Smith, D.C.** 1967b. Sugar Alcohols (Polyols) in Fungi and Green Plants. II. Methods of detection and quantitative estimation in plant extracts. *New Phytologist*, **66**, 185–204.
- Loescher, W.H.** (1987) Physiology and Metabolism of Sugar Alcohols in Higher Plants. *Physiologia Plantarum*. **70**, 553–557.
- Loescher, W.H. et al.** (1995) Sugar alcohol metabolism in source leaves. *Current Topics in Plant Physiology*. **13**, 170–179.
- MacLean, D.J. & Scott, K.J.** (1976) Identification of Glucitol (Sorbitol) and Ribitol in a Rust Fungus, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Journal of General Microbiology*. **97**, 83–89.
- Madden, T.** (2003) The BLAST Sequence Analysis Tool. In *The NCBI Handbook*. National Center for Biotechnology Information (US).
- Manning, J.C. & van Staden, J.** (1987) The Development and Mobilisation of Seed Reserves in Some African Orchids. *Australian Journal of Botany*. **35**, 343–353.
- Matros, A. et al.** (2015) Sugars as hydroxyl radical scavengers: proof-of-concept by studying the fate of sucralose in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. **82**, 822–839.

- McCormick, M.K., Whigham, D.F. & O'Neill, J.** (2004) Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist*. **163**, 425–438.
- McKendrick, S.L. et al.** (2002) Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. *New Phytologist*. **154**, 233–247.
- McKendrick, S.L., Leake, J.R. & Read, D.J.** (2000) Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytologist*. **145**, 539–548.
- Mei-sheng, T. et al.** (1985) In vitro seed germination and developmental morphology of seedling in *Cymbidium ensifolium*. *Acta Botanica Sinica*. **27**, 455–459.
- Merckx, V.S.F.T.** (2013) Mycoheterotrophy: An Introduction. V *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*. New York: Springer Science+Business Media, 1–17.
- Morandi, B. et al.** (2008) Carbohydrate availability affects growth and metabolism in peach fruit. *Physiologia Plantarum*. **133**, 229–241.
- Myers, J.S. & Jakoby, W.B.** (1973) Effect of polyhydric alcohols on kinetic enzymes. *Biochemical and biophysical research communications*. **51**, 631–636.
- Nakamura, S.J.** (1982) Nutritional conditions required for the non-symbiotic culture of an achlorophyllous orchid *Galeola septentrionalis*. *New Phytologist*. **90**, 701–715.
- Nehls, U. et al.** (1999) Isolation and characterization of a general amino acid permease from the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *New Phytologist*. **144**, 343–349.
- Noiraud, N., Maurousset, L. & Lemoine, R.** (2001) Identification of a Mannitol Transporter, AgMaT1, in Celery Phloem. *The Plant Cell*. **13**, 695–705.
- Ohta, K. et al.** (2005) Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant. *Phytochemistry*. **66**, 2822–2828.
- Oura, Y. et al.** (2000) Purification and characterization of a NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase from Japanese pear fruit. *Phytochemistry*. **54**, 567–72.

- Paduano, C. et al.** (2011) Pectin localization in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* reveals modulation of the plant interface in response to different mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. **21**, 97–104.
- Pan, Z.-J. et al.** (2014) Flower development of *Phalaenopsis* orchid involves functionally divergent SEPALLATA-like genes. *New Phytologist*. **202**, 1024–1042.
- Parniske, M.** (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*. **6**, 763–775.
- Patel, T.K. & Williamson, J.D.** (2016) Mannitol in Plants, Fungi, and Plant–Fungal Interactions. *Trends in Plant Science*. **21**, 486–497.
- Patriarca, A. et al.** (2011) Stimulating effect of sorbitol and xylitol on germination and growth of some xerophilic fungi. *Food Microbiology*. **28**, 1463–1467.
- Pellegrino, G., Luca, A. & Bellusci, F.** (2016) Relationships between orchid and fungal biodiversity: Mycorrhizal preferences in Mediterranean orchids. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. **150**, 180–189.
- Perotto, S. et al.** (2014) Gene expression in mycorrhizal orchid protocorms suggests a friendly plant–fungus relationship. *Planta*. **239**, 1337–1349.
- Peterson, R.L. et al.** (1996) The interface between fungal hyphae and orchid protocorm cells. *Canadian Journal of Botany*. **74**, 1861–1870.
- Peterson, R.L. & Currah, R.S.** (1990) Synthesis of Mycorrhizae Between Protocorms of *Goodyera-Repens* (Orchidaceae) and *Ceratobasidium-Cereale*. *Canadian Journal of Botany-Journal Canadien de Botanique*. **68**, 1117–1130.
- Pirson, A. & Zimmermann, M.H.** (1975) List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. V A. Pirson & M. H. Zimmermann, eds. *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 1 Transport in Plants 1: Phloem Transport*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 480–503.
- Plouvier, V.** (1963) Distribution of Aliphatic Polyols and Cyclitols. V T. Swain, ed. *Chemical plant Taxonomy*. London: Academic Press.
- Ponert, J. et al.** (2011) European orchid cultivation – from seed to mature plant. *European Journal of Environmental Sciences*. **1**, 95–107.

- Ponert, J.** (2009) Rané fáze vývoje semenáčků terestrických orchidejí: vliv sacharidů a fytohormonů. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze.
- Prabhavathi, V. et al.** (2002) Abiotic stress tolerance in transgenic eggplant (*Solanum melongena* L.) by introduction of bacterial mannitol phosphodehydrogenase gene. *Molecular Breeding*. **9**, 137–147.
- Prata, R. et al.** (1997) Sugar Repression of Mannitol Dehydrogenase Activity in Celery Cells. *Plant Physiology*. **114**, 307–314.
- Pridgeon, A. et al.** (2003) *Genera Orchidacearum Volume 3* 1st ed., New York: Oxford University Press.
- Purves, S. & Hadley, G.** (1976) *The Physiology of Symbiosis in Goodyera repens*, Berlin, Heidelberg: Springer.
- R Development Core Team** (2016) *R: A language and environment for statistical computing*, Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Rahnama, H. et al.** (2011) Enhanced salt stress tolerance in transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) expressing a bacterial mtID gene. *Acta Physiologiae Plantarum*. **33**, 1521–1532.
- Rasmussen, H. & Rasmussen, F.N.** (2007) Trophic Relationships in Orchid Mycorrhiza – Diversity and Implications for Conservation. *Lankesteriana*. **7**, 334–341.
- Rasmussen, H.N.** (1990) Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. f.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae) during germination in vitro. *New Phytologist*. **116**, 137–147.
- Rasmussen, H.N.** (2002) Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*. **244**, 149–163.
- Rasmussen, H.N.** (1995) *Terrestrial Orchids: From Seed to Mycotrophic Plant*. Cambridge, New York, Melbourne: Cambridge University Press.
- Richardson, K.A., Peterson, R.L. & Currah, R.S.** (1992) Seed Reserves and Early Symbiotic Protocorm Development of *Platanthera-Hyperborea* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*. **70**, 291–300.

- Richtmyer, N.K.** (1970) The isolation of volemitol and other polyhydric alcohols from avocado seeds. *Carbohydrate Research*. **12**, 135–138.
- Ruijter, G.J.G. et al.** (2003) Mannitol Is Required for Stress Tolerance in *Aspergillus niger* Conidiospores. *Eukaryotic Cell*. **2**, 690–698.
- Rumpho, M.E., Edwards, G.E. & Loescher, W.H.** (1983) A pathway for photosynthetic carbon flow to mannitol in celery leaves : activity and localization of key enzymes. *Plant physiology*. **73**, 869–73.
- Sampaio, F.C. et al.** (2003) Screening of filamentous fungi for production of xylitol from d-xylose. *Brazilian Journal of Microbiology*. **34**, 325–328.
- Scannerini, S. & Bonfante-Fasolo, P.** (1983) Comparative ultrastructural analysis of mycorrhizal associations. *Canadian Journal of Botany*. **61**, 917–943.
- van Schaftingen, E. & van Laere, A.J.** (1985) Glycerol formation after the breaking of dormancy of *Phycomyces blakesleeanus* spores. Role of an interconvertible glycerol-3-phosphatase. *European Journal of Biochemistry*. **148**, 399–404.
- Senthilkumar, S. & Krishnamurthy, K. V.** (1998) A cytochemical study on the mycorrhizae of *Spathoglottis plicata*. *Biologia Plantarum*. **41**, 111–119.
- Serrigny, J. & Dexheimer, J.** (1985) Etude Ultrastructurale Tropicale : Localisation des Endomycorhizes *Epidendrum ibaguense* et des nucleosides Orchidee des ATPases diphosphatases Le but du present travail est de presenter une etude cytoenzymologique per mettant une approche , au niveau cell. *Cytologia*. **50**, 779–788.
- Sharma, J., Ishida, M. & Yadon, V.** (2007) Mycorrhizal diversity of an endemic terrestrial orchid. *Lankesteriana*. **7**, 215–218.
- Shen, B., Jensen, R.G. & Bohnert, H.J.** (1997) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant physiology*. **113**, 1177–83.
- Shen, B., Jensen, R.G. & Bohnert, H.J.** (1997) Mannitol Protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals. *Plant physiology*. **115**, 527–532.
- Sheveleva, E. et al.** (1998) Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco. High amounts of sorbitol lead to necrotic lesions. *Plant Physiology*. **117**, 831–9.

- Shun-xing, G. & Jin-tang, X.** (1990) Studies on the changes of cell ultrastructure in the course of seed germination of *Bletilla striata* under fungus infection conditions. *Acta Botanica Sinica*. **32**, 594–598.
- Sivitz, A.B. et al.** (2006) Arabidopsis Sucrose Transporter AtSUC9. High-Affinity Transport Activity, Intragenic Control of Expression, and Early Flowering Mutant Phenotype. *Plant Physiology*. **143**, 188–198.
- Smirnoff, N. & Cumbes, Q.J.** (1989) Hydroxyl radical scavening activity of compatible solutes. *Phytochemistry*. **28**, 1057–1060.
- Smith, S. E.** (1973) Asymbiotic germination of orchids seeds on carbohydrates of fungal origin. *New phytologist*. **72**, 497–499.
- Smith, S.E.** (1967) Carbohydrate Translocation in Orchid Mycorrhizas. *New Phytologist*. **66**, 371–378.
- Smith, S.E.** (1966) Physiology and Ecology of Orchid Mycorrhizal Fungi With Reference To Seedling Nutrition. *New Phytologist*. **65**, 488–499.
- Smith, S.E. & Read, D.J.** (2008) *Mycorrhizal Symbiosis* 3rd ed., New York: Academic Press.
- Smith, S.E. & Smith, F.A.** (1973) Uptake of glucose, trehalose and mannitol by leaf slices of the orchid *Bletilla hyacinthina*. *New Phytologist*. **72**, 957–964.
- Soh, L. et al.** (2011) Fate of sucralose through environmental and water treatment processes and impact on plant indicator species. *Environmental science & technology*. **45**, 1363–9.
- Stewart, S.L. & Kane, M.E.** (2010) Effects of carbohydrate source on the in vitro asymbiotic seed germination of the terrestrial orchid *Habenaria macroceratitis*. *Journal of Plant Nutrition*. **33**, 1155–1165.
- Stewart, S.L. & Kane, M.E.** (2006) Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **86**, 159–167.
- Stöckel, M. et al.** (2014) Carbon and nitrogen gain during the growth of orchid seedlings in nature. *New Phytologist*. **202**, 606–615.

- Stoop, J., Williamson, J. & Masonpharr, D.** (1996) Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science*. **1**, 139–144.
- Stoop, J.M.H. & Pharr, D.M.** (1992) Partial purification and characterization of mannitol: mannose 1-oxidoreductase from celeriac (*Apium graveolens* var. *rapaceum*) roots. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **298**, 612–619.
- Su, C. et al.** (2013) Orchidstra: an integrated orchid functional genomics database. *Plant & cell physiology*. **54**, e11.
- Tamura, K. et al.** (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. **30**, 2725–2729.
- Tarczynski, M.C., Jensen, R.G. & Bohnert, H.J.** (1993) Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science (New York, N.Y.)*. **259**, 508–510.
- Taylor, A.F.S., Gebauer, G. & Read, D.J.** (2004) Uptake of nitrogen and carbon from double-labelled (N-15 and C-13) glycine by mycorrhizal pine seedlings. *New Phytologist*. **164**, 383–388.
- Taylor, D.L. & Bruns, T.D.** (1997) Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**, 4510–4515.
- Těšitelová, T. et al.** (2013) Ploidy-specific symbiotic interactions: Divergence of mycorrhizal fungi between cytotypes of the *Gymnadenia conopsea* group (Orchidaceae). *New Phytologist*. **199**, 1022–1033.
- Tibbett, M., Sanders, F.E. & Cairney, J.W.G.** (2002) Low-temperature-induced changes in trehalose, mannitol and arabinol associated with enhanced tolerance to freezing in ectomycorrhizal basidiomycetes (*Hebeloma* spp.). *Mycorrhiza*. **12**, 249–255.
- Uetake, Y., Farquhar, M.L. & Larry Peterson, R.** (1997) Changes in microtubule arrays in symbiotic orchid protocorms during fungal colonization and senescence. *New Phytologist*. **135**, 701–709.
- Uetake, Y. & Ishizaka, N.** (1996) Cytochemical localization of adenylate cyclase activity in the symbiotic protocorms of *Spiranthes sinensis*. *Mycological Research*. **100**, 105–112.

- Véléz, H., Glassbrook, N.J. & Daub, M.E.** (2008) Mannitol biosynthesis is required for plant pathogenicity by *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiology Letters*. **285**, 122–129.
- Waes, J.M. & Debergh, P.C.** (1986) In vitro germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum*. **67**, 253–261.
- Wang, H. et al.** (1997) A cytological study on the nutrient-uptake mechanism of a saprophytic orchid *Gastrodia elata*. *Acta Botanica Sinica*. **39**, 500–504.
- Warcup, J.H.** (1985) *Rhizantella gardneri* (Orchidaceae), its *Rhizoctonia* endophyte and close association with *Melaleuca uncinata* (Myrtaceae) in western Australia. *New Phytologist*. **99**, 273–280.
- Washüttl, J., Riederer, P. & Bancher, E.** (1973) A qualitative and Quantitative study of sugar-alcohols in several foods. *Journal of Food Science*. **38**, 1262–1263.
- Webster, J. et al.** (1986) Mannitol and hexoses are components of Buller's drop. *Mycological Research*. **99**, 833–838.
- Wedding, R.T. & Harley, J.L.** (1976) Fungal polyol metabolites in the control of carbohydrate metabolism of mycorrhizal roots of beech. *New Phytologist*. **77**, 675–688.
- Williamson, B. & Hadley, G.** (1970) Penetration and Infection of Orchid Protocorms by *Thanatephorus cucumeris* and Other *Rhizoctonia* Isolates. *Phytopathology*. **60**, 1092–1096.
- Williamson, J.** (2002) Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: polyols—multifunctional plant protection? *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **127**, 467–473.
- Witteveen, C.F.B. & Visser, J.** (1995) Polyol Pools in *Aspergillus-Niger*. *FEMS Microbiology Letters*. **134**, 57–62.
- Wright, J.R. & Le Tourneau, D.** (1965) Utilization and Production of Carbohydrates by *Pyrenochaeta terrestris*. *Physiologia Plantarum*. **18**, 1044–1053.
- Wu, J. et al.** (2013) Mycorrhizas alter nitrogen acquisition by the terrestrial orchid *Cymbidium goeringii*. *Annals of Botany*. **111**, 1181–1187.
- Wynd, F.L.** (1933) Sources of carbohydrate for germination and growth of orchid seedlings. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **20**, 569–581.

- Xu, J. & Guo, S.** (2000) Retrospect on the research of the cultivation of *Gastrodia elata* Bl, a rare traditional Chinese medicine. *Chinese Medical Journal*. **113**, 686–692.
- Yam, T.W. & Arditti, J.** (2009) History of orchid propagation: A mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports*. **3**, 1–56.
- Yancey, P. et al.** (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*. **217**, 1214–1222.
- Yeung, E.C. & Law, K.** (1992) Embryology of *Calypso bulbosa*. II. Embryo development. *Canadian Journal of Botany*. **70**, 461–468.
- Yoder, J.A., Zettler, L.W. & Stewart, S.L.** (2000) Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science*. **156**, 145–150.
- Zettler, L.W.** (1997) Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: Techniques and perspectives. *Selbyana*. **18**, 188–194.
- Zhao, X. et al.** (2014) Deep sequencing-based comparative transcriptional profiles of *Cymbidium hybridum* roots in response to mycorrhizal and non-mycorrhizal beneficial fungi. *BMC genomics*. **15**, 747.
- Zotz, G.** (2013) The systematic distribution of vascular epiphytes-a critical update. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **171**, 453–481.